METHODIK DER VITAMINFORSCHUNG

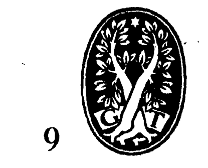
METHODIK DER VITAMINFORSCHUNG

VON

DR. PHIL. CHRISTIAN BOMSKOV
CHEMIKER AN DER UNIVERSITÄTSKINDERKLINIK KIEL

MIT EINER EINFÜHRUNG VON
PROF. DR. MED. E. ROMINGER
KIEL

MIT 92 ABBILDUNGEN



1 9 3 5

GEORG THIEME / VERLAG / LEIPZIG

Printed in Germany

Zur Einführung

Die Bedeutung der Erforschung der Vitamine ist durch die zahlreichen Ergebnisse der letzten Jahre klar und eindringlich hervorgetreten. Verschiedene große wissenschaftliche Tagungen haben als Hauptthema die Vitaminlehre behandelt und damit zum Ausdruck gebracht, daß diese in der praktischen Medizin ebenso wie in der medizinischen Forschung und auf ihren Grenzgebieten Gegenstand lebhafter Anteilnahme ist.

Allerdings zeigte sich dabei, daß die Vitaminlehre trotz der vielen sicherbegründeten Grundtatsachen noch kein fertiges Gebäude darstellt. Es bedarf noch der mühevollsten experimentellen Kleinarbeit, bis es möglich sein wird, die Einzelbausteine sinnvoll miteinander zu verbinden, und es bedarf gleichzeitig einer Sammlung von sorgfältig klinisch beobachteten Krankheitsfällen, an denen allein geprüft werden kann, wie weit die im Experiment festgestellten Tatsachen für die praktische Medizin Bedeutung haben.

Wie bei jeder neuen Entdeckung, so ging es auch in der Vitaminforschung: es wurden die gefundenen Tatsachen zunächst weit überschätzt und zum Teil wurden Feststellungen an niederen Laboratoriumstieren ohne weiteres auf die menschliche Ernährungslehre übertragen. Manche noch nicht aufgeklärten Krankheitszustände wurden mit einer derartigen schwachen oder sogar leicht angreifbaren Begründung als Avitaminosen gedeutet. Hier muß eine kritische Forschung einsetzen, die zu rasch ins Kraut geschossene theoretische Gebilde beseitigt und zunächst die Frage zu klären versucht, wie hoch der eigentliche Vitaminbedarf des Menschen in den verschiedenen Alters- und Lebenslagen ist. Schon heute wird man auf Grund einfacher Überlegungen behaupten können, daß echte Avitaminosen beim Menschen nur unter ganz besonderen Ernährungsverhältnissen auftreten, also selten sind. Trotzdem handelt es sich um eines der aussichtsreichsten Forschungsgebiete in der heutigen Medizin, Biologie und Chemie, weil die Untersuchungen über den Vitamingehalt der tierischen Organe einerseits und der pflanzlichen auf der anderen Seite voraussichtlich erst dazu führen werden, daß wir auch einen relativen Vitaminmangel beseitigen und den Menschen gewissermaßen auf dem kürzesten Wege richtig ernähren lernen. Nur unter Zuhilfenahme der experimentellen Vitamin-Testmethoden wird es uns gelingen, alle die Einflüsse zu erforschen, die z. B. Art und Menge der Vitamine in den Pflanzen zu ändern vermögen. Angefangen von Untersuchungen des Vitamingehaltes der Gräser und Kräuter, die als Vitaminquelle für unsere Milchtiere dienen, bis zu den vom Menschen genossenen Gemüsen und Früchten wird allmählich alles, was als Vitaminspender in Frage kommt, untersucht werden müssen und es werden sich erst dabei Methoden der besten Pflanzen- und Gemüseaufzucht ergeben. Ein anderes, weiteres Forschungsgebiet stellen die erst kürzlich aufgedeckten Beziehungen zwischen Hormonen und Vitaminen

dar, das nur unter Anwendung sämtlicher bekannter und brauchbarer Vitamin-Testmethoden bearbeitet werden kann.

Wir besitzen heute zwar mehrere zusammenfassende Darstellungen über die Vitamine oder die Avitaminosen, die in kurzer oder breiter Form die bisher wichtigsten Forschungsergebnisse enthalten, es fehlt aber an einer brauchbaren, zuverlässigen Anleitung zur Ausführung der neuesten Vitamin-Testmethoden. Sehr viele methodische Arbeiten sind in der ausländischen Literatur, namentlich der englischen und amerikanischen, erschienen. Deshalb waren wir bei unseren eigenen Vitaminarbeiten z. B. gezwungen, uns alle methodischen Anleitungen, die größtenteils in der ausländischen Literatur erschienen sind, mühevoll zusammenzusuchen. Darüber hinaus ließ es sich oft nicht umgehen, die verschiedenen, für ein und dasselbe Vitamin angegebenen Testmethoden selbst nebeneinander durchzuführen, um zu prüfen, welche davon für die von uns anzugehende Fragestellung die geeignetste und zuverlässigste wäre. Es ist ja nicht möglich, bei der Verschiedenheit der gestellten Aufgabe jeweils mit ein und derselben Testmethode zum Ziel zu gelangen. Ein Beispiel möge das erläutern. Man bestimmt gewöhnlich das Vitamin D mit Hilfe rachitogener Diäten, indem man junge Ratten damit füttert und die zu prüfende Substanz prophylaktisch oder therapeutisch verabreicht. Diese rachitogenen Diäten weisen aber nicht nur einen D-Mangel auf, sondern auch ein gestörtes Verhältnis Ca zu P. Enthält also die zu prüfende Substanz schon geringe Mengen Phosphate, so kann allein durch diese Phosphatzulage die Ratte vor Rachitis bewahrt bleiben und so ein Vitamin D-Gehalt vorgetäuscht werden. Bei der Untersuchung einer solchen Substanz muß man also dann entweder die zu untersuchenden Substanzen verseifen, um das Vitamin zu extrahieren oder man muß eine der anderen nicht über die Erscheinungen der Rachitis führenden Testmethoden anwenden, also z. B. den Wachstumstest oder den Knochenkalktest. Die Kost der Tiere muß dabei im Hinblick auf den sonst entstehenden Fehler die Mineralien in normaler Zusammensetzung enthalten.

Wir haben im Laufe der letzten Jahre bei diesen Arbeiten nicht nur eine ansehnliche Sammlung von methodischen Vitaminarbeiten und Mitteilungen anderer Autoren, die so liebenswürdig waren, uns durch Übersendung ihrer Arbeiten oder persönliche Auskünfte zu unterstützen, angelegt, sondern wir haben auch in der Ausführung vieler Vitamin-Testmethoden mancherlei eigene Erfahrungen auf diesem Gebiet erlangt.

Der Leiter meines Laboratoriums, Dr. phil. Bomskov, hat es nun auf meine Anregung hin unternommen, in diesem Buch die Methoden der Vitaminforschung in systematischer Weise an Hand der Sammlung fremden und eigenen Materials darzustellen. Der Zweck des Buches ist es, allen denjenigen Forschern, die auf dem Vitamingebiet sich unterrichten oder selbst arbeiten wollen, eine zuverlässige Anleitung zur Durchführung der Testmethoden zu bieten. Um eine brauchbare Beobachtung und Beurteilung der experimentellen Nährschäden zu ermöglichen, werden außerdem sämtliche Veränderungen, welche die Tiere bei den Avitaminosen zeigen, auch wenn sie nichts mit der Testmethode zu tun haben, genau geschildert. Weiter enthält das Buch die wichtigsten Angaben nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse über die Entstehung und Bildung der Vitamine, ihr Vorkommen in der Natur und im Organismus und ihre Speicherung in den verschiedenen Organen, weil gerade diese

für die Auswertung von größter Wichtigkeit ist. Auch der Bedarf der einzelnen Tierarten an den Vitaminen wird, soweit hierüber heute Untersuchungen vorliegen, angegeben.

Dr. Bomskov hat mit Recht nicht einfach eine Testmethode nach der anderen aufgenommen, sondern hat nur solche ausgewählt, die sich als wirklich brauchbar und zuverlässig erwiesen haben. Noch umstrittene Methoden werden von ihm nur kurz anhangsweise erwähnt und unsichere kurzerhand übergangen. Seine eigene chemische und biologische und namentlich experimentell praktische Erfahrung, die er während seiner 5jährigen Tätigkeit in meiner Klinik in enger Fühlung mit uns Klinikern gesammelt hat, berechtigt ihn zu dieser kritischen Auslese.

Aus der ursprünglich geplanten kleinen Einführung ist ein Buch geworden, dessen reicher Inhalt hoffentlich allen denen, die es in Gebrauch nehmen, die besten Dienste und mancherlei Anregung bieten wird und ihnen namentlich die große Mühe und Arbeit ersparen wird, die der Verfasser auf sich genommen hat.

Rominger

Vorwort

Die Vitaminforschung, eines der großen Grenzgebiete zwischen Chemie und Medizin, ist aufgebaut einerseits auf rein chemischen Methoden, andererseits auf den Methoden der experimentellen Medizin. Nur die enge Zusammenarbeit zwischen Vertretern der beiden großen Disziplinen ermöglichten es bisher, die Schwierigkeiten, die sich für den einen oder anderen bei der Handhabung der seinem Fach fremden Methoden ergaben, zu umgehen. Es ist der Zweck des vorliegenden Buches, an der Beseitigung dieser Schwierigkeiten mitzuhelfen.

Die Methodik der Vitaminforschung soll dem Chemiker die Möglichkeit an die Hand geben, seine Substanzen und Konzentrate im Tierversuch auszuwerten. Für den Mediziner, der sich experimentell mit den Nährschäden befaßt und dem die chemischen Methoden ferner liegen, sind die Kapitel bestimmt, in denen Darstellung und Reinigung der Vitaminextrakte beschrieben werden.

Die Durchführung der Tierversuche ist bis ins einzelne geschildert, da es bekanntlich Voraussetzung des Gelingens solcher Versuche ist, alle zuerst vielleicht nebensächlich erscheinenden Bedingungen auf das genaueste einzuhalten. Andererseits wurde aber auch auf die ausführliche Wiedergabe der Darstellungs- und Extraktionsverfahren Wert gelegt, um dem Mediziner nach Möglichkeit die Arbeit zu erleichtern. Schließlich wurden auch alle Methoden beschrieben, die es gestatten, auf chemischem Wege ein Vitamin auszuwerten. Die meisten können heute noch nicht den Tierversuch ersetzen. Sie sind trotzdem angeführt, als begrüßenswerte Ansätze zu Verfahren, die uns vielleicht später einmal eine Bestimmung der Vitamine, ohne Tierversuch, ermöglichen werden. Alle anderen nicht direkt mit der Methodik zusammenhängenden Arbeiten wurden, sofern sie wichtig erschienen, nur kurz gestreift.

Die Literaturangaben wurden beschränkt. Für die nichtmethodischen Kapitel verweise ich, um Wiederholungen zu vermeiden, auf die Handbücher: Sherman-Smith, The Vitamins, New York 1931; Browning, The Vitamins, London 1931, und Scheunert, Die Vitamine 1933, im Handbuch der Lebensmittelchemie.

Kiel, den 1. September 1934

Christian Bomskov

Inhaltsverzeichnis

Allgemeiner Teil

Definition des Vitaminbegriffs, Klassifizierung der Vitamine

„Vitamine sind organische Verbindungen, die in kleinster Menge dauernd dem tierischen Organismus zugeführt werden müssen, um die Erhaltung oder Vermehrung der Zellsubstanz zu ermöglichen und die normale Funktion der Organe zu gewährleisten. Nur dann sind derartige Stoffe als Vitamine zu bezeichnen, wenn sie unter geeigneten Bedingungen bereits in einer Menge wirksam sind, deren Kleinheit ihre Verwendung zur Kalorienlieferung sowie als direktes Baumaterial der Zellsubstanz ausschließt, und wenn die Zelle selbst zu ihrer Totalsynthese von sich aus nicht befähigt ist. Hierfür ist es gleichgültig, ob diese Stoffe völlig fertig mit der Nahrung zugeführt werden müssen, oder ob sie in Form unwirksamer Vorstufen in die Zelle eintreten und erst hier in das Vitamin umgewandelt werden (Carotin), oder endlich ob ihre Bildung in der Zelle zwar möglich, aber von exogenen Momenten chemischer oder physikalischer Art (Zufuhr von kleinsten Bausteinen, von katalytisch wirksamen Substanzen, von strahlender Energie) abhängig ist (Vitamine B_2 und D). (Stepp und Kühnau[1].)

Die Loslösung der Vitamine von den Hormonen ist an sich nicht berechtigt, da manche Vitamine als Hormone auftreten können, indem sie endogen gebildet werden, wie z. B. das Vitamin C bei der Ratte. Die Abtrennung der Vitamine ist nur eine didaktisch nötige Willkür, die der einzig möglichen Definition der pflanzlichen Genese bei der Wirkung auf das Tier folgt. Versuche aus neuester Zeit zeigen, daß auch eine Trennung der Vitamine von den Fermenten immer schwieriger wird, da Vitamine im Organismus in Fermente umgebildet werden können, wie z. B. das Vitamin B_2 in das gelbe Ferment der eisenfreien Atmung (Vitazyme, v. Euler 1934).

In folgendem fallen unter den Vitaminbegriff nur die bekannten, in umstehender, erweiterter Tabelle nach Stepp und Kühnau aufgeführten Faktoren. Die alte Einteilung in fettlösliche und wasserlösliche Vitamine wurde beibehalten.

Allgemeines über Testmethoden

Eine Testmethode ist eine Methode, die es erlaubt, chemisch nicht faßbare Substanzen, die dem Chemiker entweder unbekannt sind oder in solcher Konzentration vorliegen, daß chemische Methoden versagen, exakt im biologischen Versuch auszuwerten. Wir sprechen insbesondere dann von Testmethoden, wenn wir in Hormon- oder Vitaminlösungen den biologischen Wirkungswert ermitteln.

1) Stepp c. s., Klin. Fortbildg 1933, 41.

Tabelle 1

Gegenwärtig gebräuchlichste Bezeichnung in Buchstaben	Bezeichnung nach der Funktion	Synonyma	Frühere Bezeichnungen
	I. Fettlösliche Vitamine *)		
Vitamin A (McCollum, Kennedy 1916)	Antixerophthalmisches Vitamin	Biosterin (Takahashi 1922) Antiinfektiöses Vitamin (Cramer 1929)	A_2 (v. Euler 1924)
Vitamin D (McCollum 1925)	Antirachitisches Vitamin	Calciferol (Angus, Askew u. Mitarb. 1931)	A_1 (v. Euler 1924) E (Funk 1925)
Vitamin E (Sure 1925)	Antisterilitätsvitamin	—	F (Funk 1925)
—**)	Fettlösliches Wachstumsvitamin	—	1 D (v. Euler 1924) F (z.T.) (Evans, Burr 1928)
	II. Wasserlösliche Vitamine		
Vitamin B_1 (Accessory Food Factor Committee 1928)	Antineuritisches Vitamin	Aktivator (Schaumann 1911) Vitamin (Funk 1912) Antiberiberin (Suzuki) 1912) Torulin (Eadie und Mitarbeiter 1912) Oryzanin (Suzuki u. Mitarbeiter 1912) Antineuritin (Hofmeister 1918) Eutonin (Abderhalden-Schaumann 1918)	B (McCollum, Kennedy 1916, McCollum 1928) F (Sherman, Axtmayer 1927) B-P (Salmon 1927) FB (van Leersum 1929)
Vitamin B_2 (Accessory Food Factor Committee 1928)	Pellagraschutzstoff Besteht aus 3 Faktoren: 1. Wachstumsfaktor, Vitamin B_2 = Flavin von György 2. Antidermatitisfaktor = Antipellagravitamin = Vitamin B_6 nach György 3. Antianämischer Faktor = Antispruevitamin = extrinsic factor (Castle)	Antidermatitisfaktor (Peters 1929) Antianämisches Vitamin (z. T.) (Sure, Kik, Smith 1931)	P—P (Goldberger 1925) P (Funk 1925) B (Chick, Roscoe 1927) G (Sherman, Axtmayer 1927) GB (van Leersum 1929) F (Kruse, McCollum 1929)

*) Funk hat für diese Gruppe die Bezeichnung „Vitasterine" vorgeschlagen, die sich allerdings nicht eingeführt hat.

**) Bisher ohne allgemein anerkannte Buchstabenbenennung.

Gegenwärtig gebräuchlichste Bezeichnung in Buchstaben	Bezeichnung nach der Funktion	Synonyma	Frühere Bezeichnungen
Vitamin B_3 (Williams, Waterman 1927; Peters 1930)	Alkalilabiles Wachstumsvitamin der Taube	Vitamine d'entretien ou de fonctionnement; vitamine d'utilisation nutritive (Randoin, Lecoq 1926); third pigeon factor (Peters 1929); factor of rising nutrition (Carter, Kinnersley, Peters 1930)	B_4 (Peters 1929)
Vitamin B_4 (Reader u. Peters 1930)	Alkalilabiles Wachstumsvitamin der Ratte	third rat factor (Peters 1929)	B_3 (Reader 1929)
Vitamin B_5 (Carter, Kinnersley, Peters 1930)	Alkalistabiles Wachstumsvitamin der Taube	Fourth pigeon factor; factor of maintenance nutrition (Carter u. Mitarb. 1930); vitamine d'utilisation cellulaire (Randoin, Lecoq 1929)	
—*)	Alkalistabiles Wachstumsvitamin der Ratte	Fourth rat factor (Peters 1930)	hDr (?) (v. Euler 1924) Y (Chick, Copping 1930)
—*)	Wachstumsfaktor der Forelle	—	H (McCay, Bing, Dilley 1928)
Vitamin C (Drummond 1919)	Antiskorbutisches Vitamin	Antiskorbutin (Holst 1912) Ascorbinsäure (Szent-Györgyi 1933)	—
Vitamin H (György 1931)	Seborrhoeverhütendes Vitamin	Hautfaktor (György 1931)	—
	III. Nicht klassifizierbares Vitamin		
—*)	Wasserunlösliches Wachstumsvitamin der Ratte	Insoluble rat factor (Hunt 1928)	R (Williams, Lewis 1930)

Bevor eine Methode als Test angewandt werden kann, muß sie verschiedenen Anforderungen genügen: Die als Kriterium der Wirkung ausgewählte Reaktion muß spezifisch sein und darf unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht etwa spontan auftreten. Die Zeitdauer einer Auswertung muß auf wenige Wochen, besser noch auf Tage beschränkt werden. Wesentlich für die Brauchbarkeit eines Tests ist seine Empfindlichkeit, die derart sein soll, daß schon kleine Dosen deutliche Wirkungen hervorrufen, eine Forderung, die hinsichtlich

*) Bisher ohne allgemein anerkannte Buchstabenbenennung.

Materialverbrauchs eine Rolle spielt. Der Test muß an wenigen Tieren leicht ausführbar sein, da sonst nicht unerhebliche Kosten für Tiermaterial eine laufende Standardisierung belasten.

Die Fehlergrenze der Testmethoden unterschreitet auch im günstigsten Fall selten die Werte von 25 % ±. Das ist für den Chemiker, der gewohnt ist, seine Analysen auf die vierte Dezimale genau auszurechnen, etwas Ungewohntes. Dafür sind aber viele Testobjekte weit empfindlicher als die beste Analysenwaage. So können, um nur ein Beispiel zu nennen, bei der Auswertung des antirachitischen Vitamins im Rattenversuch 0,01 γ gut erkannt und bestimmt werden. (1 $\gamma = {}^1/_{1000}$ mg) (Laquer). Die Genauigkeit jeder Testmethode hängt ab von der Menge des benutzten Tiermaterials. Jede Standardisierung wird um so genauer, je mehr Tiere man benutzt. Selbst ein guter Test verlangt für jede zu prüfende Dosis mindestens 5 Tiere. Eine genaue Standardisierung der Vitamine A und D ist nur mit 10 Tieren pro Dosis ausführbar.

Bei Wiederholung einer Auswertung, unter Einhaltung der in einem Laboratorium gesammelten Erfahrungen, wird es einem zweiten Laboratorium mit derselben Methode nur sehr schwer möglich sein, dieselben Ergebnisse zu erzielen. Selbst im selben Institut weichen die Ergebnisse zu verschiedenen Zeiten voneinander ab. Diese, als jahreszeitliche Schwankungen angesprochene Empfindlichkeitsänderung kann teilweise dadurch ausgeschaltet werden, daß ein Standardpräparat in jedem Versuch mitläuft und die gefundenen Werte darauf bezogen werden.

Ausschlaggebend für das Gelingen einer biologischen Standardisierung ist die Haltung und Pflege der Tiere. Es ist selbstverständlich, daß Versuche mit wahllos gekauften Tieren von vornherein zum Scheitern bestimmt sind. Namentlich Ratten und Mäuse müssen einer Zucht entstammen, die unter hygienisch einwandfreien Bedingungen gehalten wird.

Allgemeines über die Haltung der Versuchstiere

1. Haltung und Pflege der Ratten

Als Versuchstier dient die Albinoratte, entweder reinrassig oder gekreuzt. Ratten erreichen ein Alter von 3 Jahren. Die Schwangerschaft dauert 3 Wochen, die Zahl der Jungen beträgt 10—12. Weiße oder schwarzweiße Tiere sind für viele Zwecke gleichwertig. In manchen Fällen sind reinrassige Tiere zu bevorzugen. Männliche Ratten wachsen stärker als weibliche. Das Geburtsgewicht ist gleich (4—5 g), die Gewichtszunahmen bis zum 60. Tage dieselben.

In den Donaldsonschen 2) Tafeln, die die Entwicklung der Ratten zeigen, erreichen die Tiere mit 30—40 Tagen ein Gewicht von 40 g. Diese Angaben stimmen im allgemeinen für deutsche Verhältnisse besser als die Tafeln von Hartwell 3), dessen Tiere schon mit 21 Tagen 40 g schwer sind.

Die Einrichtung und Betreuung einer Rattenzucht erfordert viel Sorgfalt, wenn Fehlschläge vermieden werden sollen. Die in manchen Instituten übliche Haltung sämtlicher Tiere auf Drahtrosten, die natürlich hinsichtlich der Säuberung Vorteile bietet, ist für Muttertiere ungeeignet. In manchen Fällen ver-

2) Donaldson, The Rat. Mem. Wistar Instit. Anat. a. Biol. 1915, Nr. 6.
3) Hartwell, Biochemic. J. 21, 1076 (1927); 17, 208 (1923).

streuen die Tiere ihre Jungen, verweigern die Aufzucht oder verzehren sie. Die Drahtnetze sind meist zu scharf und bieten den Jungen von unten keinen genügenden Wärmeschutz. Wir verwenden mit gutem Erfolge Käfige, die im folgenden kurz beschrieben seien.

Aus Abb. 1 geht die Konstruktion unserer Zuchtkäfige hervor. Ein Käfigblock, der 9 Einzelkäfige enthält, ist etwa 150 × 170 × 50 cm groß.

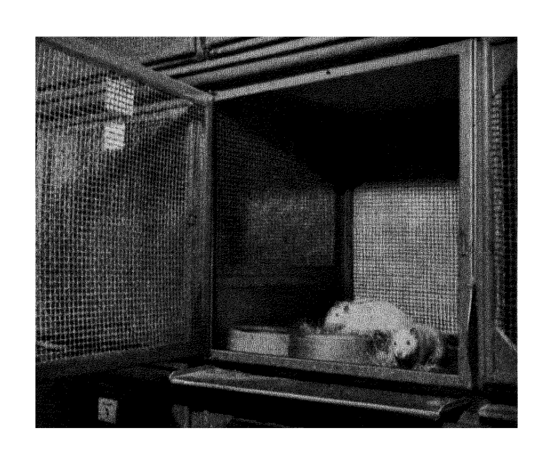


Abb. 1. Zweckmäßige Zuchtkäfige für Ratten (rechts i. Bild).

Abb. 2. Ein Einzelraum der in Abb 1 gezeigten Käfige.

Jeder Einzelraum (Abb. 2) mißt 0,5 cbm. Der Boden besteht aus einem abnehmbaren Metallnetz, unter dem eine herausziehbare verzinkte Platte liegt, auf der die Exkremente aufgefangen werden. Die Einzelkäfige, die mit Holzwolle versehen sind (täglich erneuert), beherbergen 4—6 Rattenweibchen mit 1 männlichen Tier.

Sobald die Rattenweibchen trächtig sind, werden sie in Einzelkäfige gesetzt, die in Abb. 3 zu sehen sind.

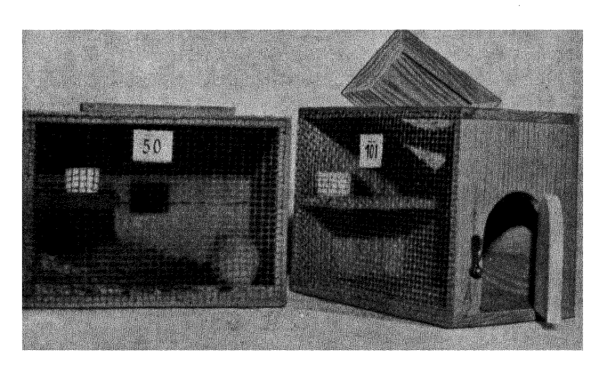


Abb. 3. Einzelkäfig für trächtige Ratten.

Jeder Käfig besteht aus halb- oder ganzzölligem Holz und mißt 40 cm in der Länge, 30 cm in der Höhe und 25 cm in der Tiefe. Die Käfige besitzen seitlich eine Tür zur Reinigung und oben eine Öffnung mit Deckel zur leichteren Fütterung. Die Vorderseite besteht aus Drahtgeflecht. Jeder Käfig ist mit Sitzbrett versehen. Die Käfige enthalten eine Schicht Holzmehl (Sägemehl) und genügend Holzwolle zur Nestbildung.

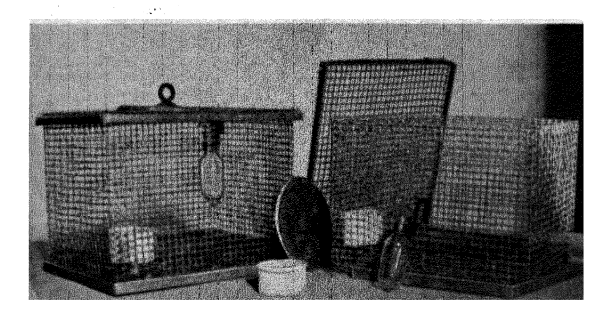


Abb. 4. Versuchskäfig für Ratten und Mäuse mit erhöhtem Drahtgeflechtboden.

Die Käfige werden täglich aus der seitlichen Tür gesäubert, wobei nach dem Werfen das Nest, das gewöhnlich unter dem Sitzbrett liegt, unberührt bleibt. Die Sägemehlschicht wird erneuert, die Nahrungsreste entfernt.

Für Versuchszwecke benutzen wir ausschließlich folgenden Käfig mit abnehmbaren Deckel und erhöhtem Drahtgeflechtboden (3 cm), der die Koprophagie ausschaltet. Die Käfige stehen auf verzinkten Eisenblechen, die täglich mit Wasser zu säubern sind.

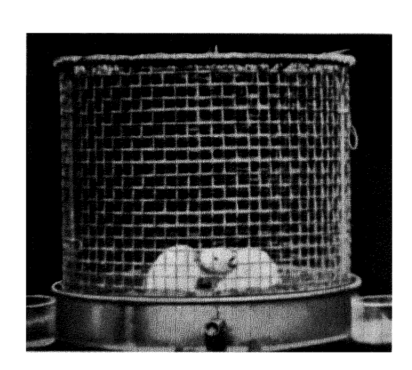


Abb. 5. Versuchskäfig für Ratten. (Nach Schultz.)

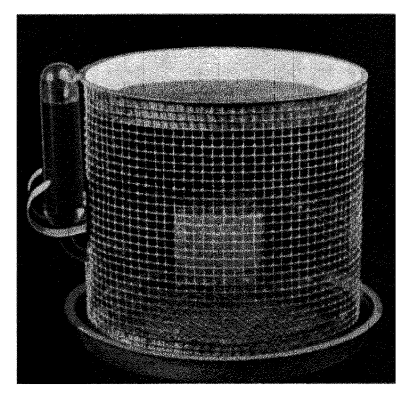


Abb. 6a. Versuchskäfig. (Nach Pittenger.)

Der Deckel wird mit Bleigewichten beschwert. Die Käfige sind 25 cm lang, 17 cm hoch und 20 cm breit.

An Versuchskäfigen sind verschiedene Modelle im Gebrauch. Zu erwähnen ist der Ferrysche Käfig, der aus einem runden, glockenförmigen, unten offenen Drahtgeflecht besteht, das über ein auf drei Füßen ruhendes Drahtnetz gestülpt wird, auf dem die Tiere sitzen. Beide Teile stehen in einem emaillierten Topf.

Ähnlich gebaut ist der Käfig von Pittenger[4]), der in Abb. 6a u. 6b in allen Einzelheiten zu sehen ist.

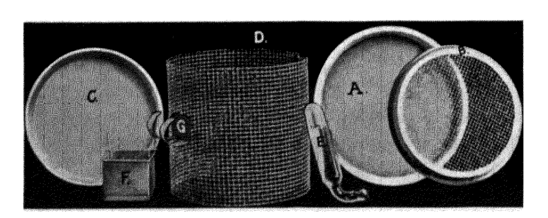


Abb. 6b. Einzelteile des Pittengerschen Käfigs. A = Käfigboden zum Auffangen der Exkremente, B = Drahteinsatz (Sitzfläche), C = Deckel, D = Drahtmantel, E = Trinkflasche, F = Futternapf, G = Aufhängevorrichtung für die Trinkflasche.

4) Pittenger, Amer. J. Pharmacy 100, 83 (1928).

Als Versuchskäfige sehr praktisch und leicht zu säubern sind auch emaillierte Kochtöpfe, die ein auf Bleifüßen ruhendes Drahtnetz als Sitzfläche haben (5 cm über dem Boden) und mit einem Deckel aus Drahtgeflecht versehen sind.

2. Haltung und Pflege der Mäuse

Als Versuchsmaus kommt die Albinomaus in Frage. Die Trächtigkeitsdauer beträgt 3 Wochen, die Zahl der Jungen 4—6. Mäuse sind schwierig zu züchten, solange man nicht über genügende Erfahrungen verfügt.

Wir halten unsere Mäuse in den oben für Ratten beschriebenen Holzkäfigen, die mit Sägemehl und Holzwolle versehen sind. Ein solcher Käfig bietet für 6—8 Weibchen mit einem männlichen Tier genügend Platz. Die Tiere kommen, sobald sie trächtig sind, in Einzelkäfige aus Glas, die in Abb. 7 zu sehen sind. Die Käfige enthalten grobes Sägemehl und eine Handvoll sehr kurzhalmiges, weiches Heu zur Nestbildung. Wir haben mit Heu bedeutend bessere Erfahrungen gemacht als z. B. mit Holzwolle. Die Tiere bleiben im Käfig bis die Jungen etwa 21 Tage alt sind. Wenn nötig, muß der Behälter öfter gereinigt werden, jedoch nicht bevor die Jungen selbständig herumkriechen.

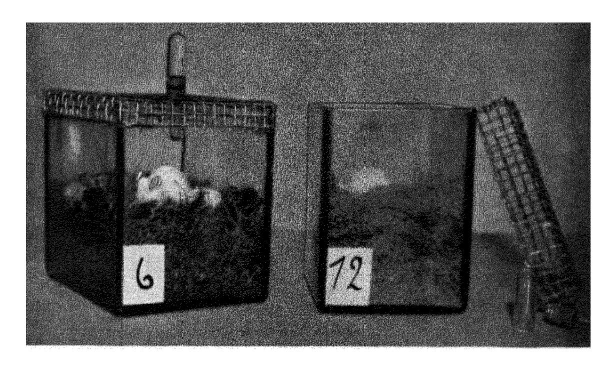


Abb. 7. Einzelkäfig für trächtige Mäuse, auch als Versuchskäfig geeignet.

Für die Haltung der Mäuse praktisch sind weiter die von Mitchell 5) angegebenen Versuchskäfige, die aber für Reihenversuche weniger geeignet sind. Versuchsmäuse halten wir in denselben Glaskäfigen, die dann etwa 3 cm über dem Boden (und über der Sägemehlfüllung) ein nicht zu weitmaschiges Drahtnetz haben. Man kann in diesen Kästen den Futternapf zwischen Boden und Drahtnetz einklemmen und dabei im Draht eine kleine Öffnung lassen, durch die eine Maus gerade den Kopf zwängen kann, um zu dem Futter zu gelangen. Eine solche Anordnung wird vielfach empfohlen, um das Verstreuen des Futters unmöglich zu machen.

Sehr wichtig ist im Mäusestall die Einhaltung einer konstanten Temperatur, die etwa zwischen 21 und 22^0 liegen kann. Frische Luft mit genügendem Feuchtigkeitsgrad, Ruhe und stark gedämpftes Licht bilden die Voraussetzung beim Arbeiten mit Mäusen.

Als Hilfmittel bei der Altersbestimmung der Tiere sei angegeben, daß die ohne Behaarung zur Welt kommenden Jungen bereits am 11.—12. Tag einen dicken seidenartigen Pelz zeigen. Die Öffnung der Augen erfolgt regelmäßig am 12. bis 13. Tag. Das Maximalgewicht der männlichen Mäuse wird in der 91. Lebenswoche, das der weiblichen in der 94. Woche erreicht.

---

5) Mitchell, J. Labor. a. clin. Med. 7, 299 (1922).

3. Haltung und Pflege größerer Tiere

a) Kaninchen. Für Versuchszwecke sind gemischtrassige Kaninchen im allgemeinen reinrassigen oder gar Riesenrassen vorzuziehen. Trächtigkeitsdauer des Kaninchens 4 Wochen, Zahl der Jungen 5—10.

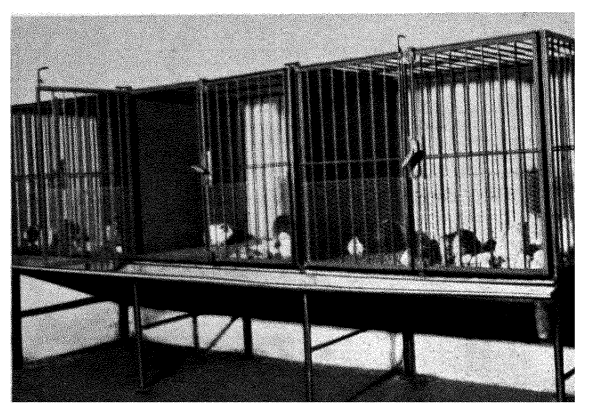


Abb. 8. Käfige für größere Tiere (Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben, Hühner. Für letztere mit Drahtgeflecht abkleidbar [in der Abb. angedeutet]).

b) Meerschweinchen. Das Meerschweinchen ist das typische Tier für den Vitamin C-Versuch. Rein weiße Tiere oder rehfarbene Tiere sollen bei der Reaktion auf Vitamin C aus der Reihe fallen. Trächtigkeitsdauer des Meerschweinchens 9 Wochen, Zahl der Jungen 1—3.

Kaninchen und Meerschweinchen können in Holzkäfigen gehalten werden. Die Sitzfläche besteht meist aus engen Holzrosten mit einer Strohschicht darüber. Wir benutzen folgende Käfige, mit denen wir recht zufrieden sind*):

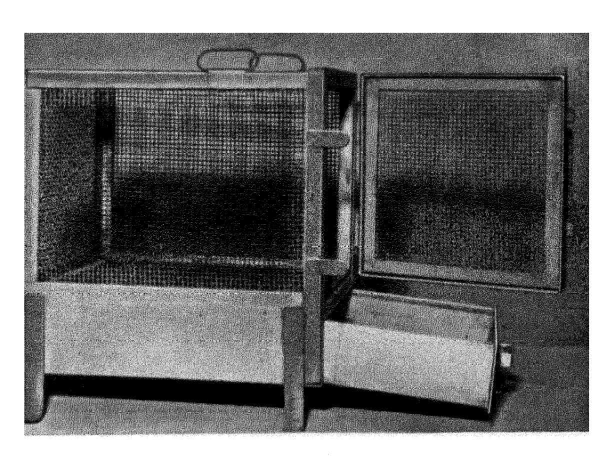


Abb. 9. Laboratoriums- und Transportkäfig für Kaninchen und Meerschweinchen.

Jeder Käfigblock umfaßt drei durch herausziehbare Scheidewände getrennte Einzelräume, deren Boden aus einem ausgestanzten dicken Aluminiumblech besteht (Öffnungen 0,5 qcm). Die Exkremente werden auf einer darunterliegenden Blechplatte aufgefangen. Käfige für Kaninchen und Meerschweinchen dürfen nie eine Sitzfläche aus Metalldrahtnetz haben, da der scharfe Draht den Tieren nicht zuträglich ist.

Als Laboratoriums- und Transportkäfig benutzen wir folgenden. Die Konstruktion geht ohne weiteres aus der Abb. 9 hervor.

*) Sämtliche angeführten Käfige sind durch die Fa. Schumann & Ehlers, Kiel, Burgstraße, zu beziehen.

4. Haltung und Pflege von Tauben, Hühnern und Kücken

Tauben und Hühner werden in geräumigen Drahtkäfigen gehalten oder aber in den oben beschriebenen Käfigen für Meerschweinchen nach Abkleidung mit Drahtgeflecht, wie in der Abb. 9 angedeutet. Kücken sind wärmebedürftig. Sie werden in besonderen heizbaren Kästen während der Versuchsdauer gehalten (s. S. 34). Bei Versuchen mit Hühnern und Kücken ist es nötig, die Käfige mit Musselin zu überdecken, da die Tiere sonst Fliegen und Ungeziefer fressen.

Ein praktischer Versuchskäfig für Tauben ist in Abb. 10 zu sehen. Die rechte Trommel enthält Reis.

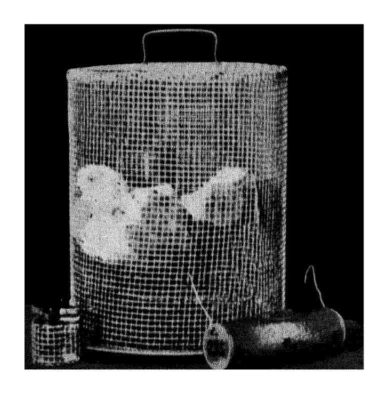


Abb. 10. Praktischer Versuchskäfig für Tauben. (Nach Funk 6).)

5. Käfige zum Auffangen von Kot und Urin

Die üblichen Stoffwechselkäfige, wie sie Abb. 11 und 12 zeigen, bestehen aus Glaszylindern mit einem Einsatz aus Drahtgeflecht. Das obere Drahtnetz ist weitmaschiger als das darunterliegende, das den Kot auffängt. Beide liegen etwa 4—5 cm auseinander, um zu verhindern, daß die Ratte den Kot herausholt. Der Urin sammelt sich am Boden des Zylinders und kann getrennt untersucht werden.

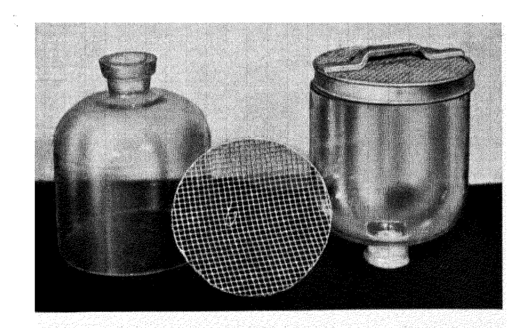


Abb. 11. Glockengefäße für Stoffwechselversuche mit Ratten und Mäusen.

Eine andere Form besteht aus einer umgekehrten Glasglocke. Durch ein daruntergestelltes Gefäß kann der Urin jederzeit entnommen werden.

Diese Stoffwechselgefäße lassen sich in jeder Größe anfertigen. Sie besitzen zweifellos ihre Vorteile vor den Metallkäfigen (quantitativ auszuspülen — leichter zu reinigen — nicht rostend), trotzdem möchte ich sie für längerdauernde Stoffwechselversuche nicht empfehlen. Wir haben die Erfahrung gemacht, daß die Tiere in diesen Glasgefäßen nicht recht gedeihen, wahrscheinlich durch zu schlechte Ventilation. Etwas besser sind in dieser Hinsicht die Glockengefäße.

Die besten Ergebnisse bei Stoffwechseluntersuchungen haben wir mit Käfigen erzielt, die in Abb. 13 zu sehen sind. Die

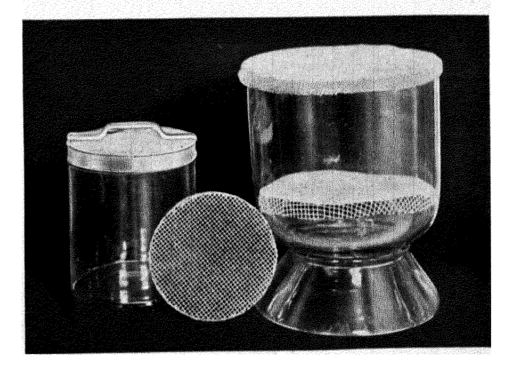


Abb. 12. Zylindergefäße für Stoffwechselversuche.

6) Funk, Die Vitamine.

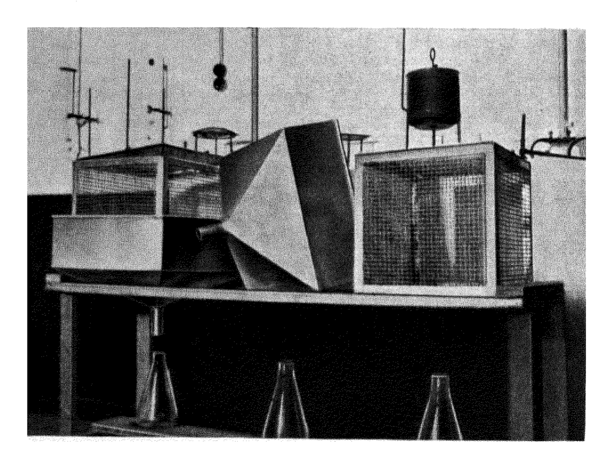


Abb. 13. Zweckmäßiger Stoffwechselkäfig.

Käfige sind genau so gebaut wie unsere Versuchskäfige für Ratten (s. Abb. 4). Sie werden in einen Ganzmetalltrichter gesetzt, der mit Abfluß versehen ist. Die Ränder des viereckigen Trichters sind hochgebogen, so, daß sie etwa die halbe Höhe des Käfigs rundherum verdecken, eine Maßnahme, die nötig ist, um Urinverlust zu vermeiden. Der Boden des Trichters trägt ein feinmaschiges Metallsieb, das Kot und Futterreste zurückhält. Der Urin kann durch ein Gefäß aufgefangen werden. Die Trichter werden auf ein Gestell mit zwei parallel verlaufenden Leisten gesetzt. Wir verwenden diese Anordnung auch für Stoffwechseluntersuchungen größerer Tiere in entsprechend größerer Form. Die Käfige dürfen nie mit Holzwolle oder ähnlichem versehen werden, da diese große Mengen Urin aufsaugt.

Einen viel gebrauchten Stoffwechselkäfig, der aber für größere Untersuchungsreihen recht kompliziert und auch zu kostspielig ist, hat Macallum (l. c. 6) angegeben. Der Käfig soll ein Verstreuen der Nahrung unmöglich machen.



Abb. 14. Stoffwechselkäfig nach Macallum. (Nach Funk.)

6. Wassernapf. 7. Erlenmeyer zum Harnauffangen. 8. Einrichtung zur getrennten Aufnahme von Harn und Fäzes (der Harn fließt an der Außenseite der Kugel in den Erlenmeyer, während die Exkremente in einen Becher fallen). 9. Futternäpfe verschiedener Größe. 10. Trichter verschiedener Größe, sich dem Alter der Ratten anpassend, wodurch das Zerstreuen der Nahrung unmöglich gemacht wird.

Spontanerkrankungen der Versuchstiere

Die Spontanerkrankungen der Laboratoriumstiere können die Auswertung der Vitamine in erheblichem Maße stören. Wir verfolgen deshalb die Technik, nach Beendigung eines Versuchs jedes Tier zu töten und genauestens zu sezieren, um dadurch evtl. Unstimmigkeiten des Versuchs, die durch eine Erkrankung des Tieres hervorgerufen sein können, auszumerzen.

Die Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere sind zu mannigfaltig, als das hier darauf eingegangen werden kann. Es sei auf das aus-

gezeichnete Werk von Jaffé: Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere, verwiesen 7).

Nur einige Maßnahmen seien hier angeführt, um Infektionen im Tierstall zu vermeiden. Im Ratten- und Mäusestall haben wir sehr gute Erfolge gesehen durch tägliches Zerstäuben von Fichtennadelöl in Alkohol, das nebenher den Vorteil hat, gut zu riechen *). Namentlich bei Ratten und Mäusen sehen wir ab und zu Ohrräude auftreten, doch ist die Häufigkeit nach Einführung des Zerstäubungsverfahrens ganz außerordentlich gesunken. Therapeutisch behandeln wir die Ohrenräude durch Bepinseln mit Chloramin T in chloriertem Paraffinöl. Die Fliegenplage im Tierstall kann wirksam bekämpft werden durch Zerstäuben von Flit. Die beste Prophylaxe ist immer noch die Sauberkeit im Tierstall. Sämtliche Käfige sind täglich zu säubern, nichtgefressene Nahrungsreste zu entfernen. Die Auffangbleche werden täglich mit Wasser gereinigt. Nach Beendigung eines Versuchs wird der Käfig gründlich mit Lysolwasser behandelt. Ebenso sind die großen Zuchtkäfige mindestens wöchentlich zu reinigen. Eine Grundforderung für den Tierstall ist frische Luft. Zugluft ist aber auf jeden Fall zu vermeiden. Unsere Tierställe werden durch Ventilatoren gelüftet. Die Luft wird durch einen 6 m langen, von einem Heizungsrohr erwärmten Blechkanal, von außen zugeführt.

Sehr wichtig ist bei der Haltung der Ratten und Mäuse Ruhe im Tierstall. Man sorge stets für stark gedämpftes Licht. Grelles Licht ist den kleinen Nagern schädlich.

Allgemeines über Kostformen für den Tierversuch

1. Andere auf Nahrungsinsuffizienz beruhende Erkrankungen außer den Avitaminosen

Typische Mangelkrankheiten entstehen nicht nur bei Fehlen der Vitamine in der Kost, sondern auch bei mangelndem Angebot an Eiweißbausteinen, Fetten und auch Mineralien. Deckung des Eiweißbedarfs durch minderwertige Proteine wie Glutin, Zein, Gliadin oder Hordenin gewährleistet nicht die normale Entwicklung eines Organismus. Es fehlen in diesen Eiweißarten gewisse Aminosäuren wie Histidin, Tryptophan, Cystin, Tyrosin und Lysin, die namentlich für das Wachstum von Bedeutung sind. Auch bei vollkommen fettfreier Diät entsteht bei Ratten Wachstumsstillstand und ein typisches Krankheitsbild (scaily tail) mit Hautaffektionen. Immer wieder reproduzierbar sind ferner die auf Mineralmangel der Kost beruhenden Erkrankungen. So erzeugt Magnesiummangel ein schweres Krankheitsbild, dessen Hauptsymptome Vasodilatation, Herzarrhythmie und tonisch-klonische Krämpfe sind, und das in kurzer Zeit zum Tode führt. Chlormangel äußert sich beim Hund in Erbrechen, Appetitlosigkeit und nervösen Erscheinungen. Mangel an Kalk oder Phosphor führt bei Ratten zu Wachstumsstillstand und Osteoporose.

*) Als Insektenpulver sehr gut bewährt hat sich uns das Cutralin der I. G.-Farbenindustrie. Es ist ein staubfeines Pulver, das mit Hilfe eines Gummiballzerstäubers verteilt wird.

7) Jaffé, Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Springer, Berlin 1931.

Es ist deshalb für Vitaminversuche unbedingt erforderlich, mit einer optimal zusammengesetzten Kost zu arbeiten, um alle anderen Störungen, als die auf Vitaminmangel beruhenden, auszuschalten. Dabei ist besonders Gewicht zu legen auf die Vollwertigkeit der Eiweißzufuhr und auf ausreichendes Mineralangebot.

Wir unterscheiden zwei Arten von Kostmischungen: solche, die natürliche Bestandteile enthalten, wie die Haferkost des Meerschweinchens oder die Reiskost der Tauben und solche, die aus künstlichen Bestandteilen bestehen. Letztere enthalten gewöhnlich als Eiweißquelle das hochwertige Casein.

2. Die Ernährung der Versuchsratten

Die Ernährung eines Rattenstamms, also einer Zucht, aus der man junge Tiere für Vitamintestversuche nimmt, stößt gewöhnlich auf Schwierigkeiten. Erstens darf man die Tiere nicht mit einem sehr vitaminreichen Futter ernähren, weil sie dann die zugeführten Vitamine ihren Jungen übermitteln, die sie speichern und gegen die Avitaminose zu resistent werden. Zweitens sollen die Tiere sich in genügendem Maße vermehren, weil natürlich für Reihenversuche größere Mengen junger Tiere benötigt werden. Drittens sollen die einzelnen Würfe an Zahl nicht zu klein sein, da Würfe von 3—4 Tieren infolge Vitaminspeicherung ebenfalls unbrauchbar sind.

Eine wahlfreie Ernährung erfüllt nur die beiden letzten Forderungen, aber nicht die erste. Deshalb müssen Tiere, die für die Auswertung der Vitamine herangezogen werden, regelmäßig dasselbe Futter erhalten. Namentlich die Amerikaner haben frühzeitig diese Forderung erkannt und Zuchtdiäten, sog. „stock"-Diäten, beschrieben. Diese Zuchtdiäten haben ihre Nachteile. Der Hauptfehler aller ist der, daß die Tiere entweder sich nicht in dem gewünschten Ausmaß vermehren oder, daß sie zwar Junge zur Welt bringen, sie aber nicht aufziehen können.

Moore fand sowohl an Zahl der Jungen, als auch an Gewicht die besten Ergebnisse auf einer natürlichen Kost. Danach kam eine synthetische Mischung mit 10% Hefe. Die schlechten Ergebnisse hinsichtlich Laktation auf synthetischen Diäten sind vielleicht auf Mangel an Mangan zurückzuführen. Glanzmann 9) konnte feststellen, daß ein Mangangehalt der Kost von 0,05% genügend ist für den Ablauf einer normalen Laktation. Mangan kann zugeführt werden mit Vollkornbrot, Salat, Spinat und Lattich.

Die hauptsächlichste Literatur über Ernährung der Versuchstiere findet man bei Greenman-Duhring und Hartwell-Mottram 10), 11). Die wichtigsten Kostformen, mit denen man leidliche Ergebnisse erzielt, seien angeführt. Außer diesen kennen wir eine ganze Reihe anderer, die aber teilweise abgelehnt wurden, oder mit denen keine genügenden Erfahrungen vorliegen. Nicht aufgeführt sind hier ferner einige weitere „stock"-Diäten, die namentlich bei der Prüfung der Vitamine A und D Verwendung finden und dort unter den Testmethoden zu finden sind.

---

9) Glanzmann, Z. Vitaminforschg 1934.

10) Greenman-Duhring, Breeding and Care of Albino Rats for Research Purposes. Philadelphia 1924.

11) Hartwell c. s., Technik of Breeding Albino Rats. Biochemic. J. 17 (1923).

3. Zuchtdiäten für Ratten (siehe auch bei Vitamin A und D)

Die Zuchtdiäten sind natürlich je nach dem zu testenden Vitamin verschieden. Ratten speichern Vitamin A und D. Tiere, die für die Untersuchungen dieser Vitamine verwandt werden sollen, dürfen natürlich keine an diesen Substanzen reiche Kost erhalten, da sie dann für den Test unbrauchbar werden. Für den Test auf Vitamin B ist dagegen die Vordiät der Tiere weniger wichtig.

Zuchtdiäten für Ratten, sog. „stock"-Diäten, sind folgende:

Diät nach Steenbock 12):

Mais, gemahlen	76 %
Leinsamenmehl.	16 %
Casein, roh	5 %
Alfalfa, gemahlen . . .	2 %
Kochsalz	0,5 %
Calciumcarbonat	0,5 %

Dazu rohe Milch ad libitum

Diät nach Sherman 13):

Weizen, ganz gemahlen	67 %
Vollmilchtrockenpulver .	33 %

oder:

Weizen, ganz gemahlen .	65,8 %
Vollmilchtrockenpulver .	32,9 %
Kochsalz	0,65 %
Calciumcarbonat	0,65 %

Diät nach McCollum 14):

Weizen, ganz gemahlen	67,5 %
Casein, roh	15 %
Vollmilchtrockenpulver	10 %
Butterfett	5,2 %
Kochsalz	0,8 %
Calciumcarbonat	1,5 %

Diät nach Coward 15):

Mais, gelb, gemahlen	65 %
Weizen, ganz gemahlen	20 %
Casein, rein	9 %
Trockenhefe	5 %
Kochsalz	0,5 %
Calciumcarbonat	0,5 %

Dazu erhalten die Tiere 20 % dieser Mischung an Vollmilchtrockenpulver und weiter zweimal wöchentlich je Tier 2 g frische Leber und 2 g frisches Gemüse (Kresse). Während der dritten Laktationswoche gibt man keine Leber, damit die Jungen nicht eine zu große Vitamin A-Reserve erhalten. Tiere, die für den Vitamin A-Test Verwendung finden sollen, erhalten besser in 14 Tagen dreimal je 2 g Fleisch und nur einmal 2 g Leber. Die Tiere sind im Gewicht von 40—50 g für den A-Test und im Gewicht von 55—60 g für den B-Test brauchbar (vgl. aber die Erfahrungen von Laquer und Mitarbeitern mit dieser Kost).

Wie aus folgender Tabelle hervorgeht, gedeihen die Tiere auf der Diät gut. Die Durchschnittsgewichte der verschiedenen Alter sind:

---

12) Steenbock, Science 58, 449 (1923).
13) Sherman, J. of biol. Chem. 60, 5 (1924).
14) McCollum, zit. nach J. of biol. Chem. 82, 345 (1929).
15) Coward, Biochemic. J. 26, 678 (1932).

Tabelle 2

Alter	Gewicht der männlichen	weiblichen Tiere
4 Wochen	45,3	41,8
5 „	61,3	55,6
6 „	83,7	71,3
7 „	103,4	84,2
8 „	121,1	95,6
9 „	137,5	105,8
10 „	150,4	115,0
11 „	163,1	123,1
12 „	175,0	129,6

Diät nach Irvine-Brand-Nelson 16):
(Die Diät ist eine modifizierte Steenbock-Diät)

Maismehl aus ganzem Mais . . . . 64 %
Leinsamenmehl . . . . 16 %
Hefe, trockne Brauereihefe . . . . 2 %
Weizenkeime, trocken . . . . 10 %
Casein, roh . . . . 5 %
Alfalfa, gemahlen . . . . 2 %
Kochsalz . . . . 0,5 %
Calciumcarbonat . . . . 0,5 %
dazu pro Tier/Tag 10 g frische Vollmilch

oder:

Hafergrieß . . . . 35 %
Mais, gemahlen . . . . 38 %
Alfalfa, gemahlen . . . . 5 %
Weizenkeime, trocken . . . . 9 %
Leinsamenmehl . . . . 5 %
Trockenbuttermilch . . . . 3 %

Diät nach Jones-Robson 17)
(modifizierte Steenbock-Diät):

Mais, gemahlen . . . . 71 %
Leinsamenmehl . . . . 16 %
Casein, roh . . . . 5 %
Alfalfa, gemahlen . . . . 2 %
Vollmilchtrockenpulver . . . . 5 %
Kochsalz . . . . 0,5 %
Calciumcarbonat . . . . 0,5 %

Diät nach Bills-Honeywell-Wirick-Nußmeier 18)
(modifizierte Steenbock-Kost):

Mais, gelb, gemahlen . . . . 57 %
Vollmilchtrockenpulver . . . . 25 %
Leinsamenmehl . . . . 12 %
Casein, roh . . . . 3,7 %
Alfalfa, gemahlen . . . . 1,5 %
Jodspeisesalz . . . . 0,4 %
Calicumcarbonat . . . . 0,4 %

16) Irvine c. s., J. of biol. Chem. 88, 449 (1930).
17) Jones c. s., J. of biol. Chem. 91, 43 (1931).
18) Bills c. s., J. of biol. Chem. 90, 619 (1931).

dazu Wasser ad libitum. Junge Ratten, deren Mütter auf dieser Kost gehalten wurden, wiegen mit 24 Tagen etwa 50 g und sind dann für den „line test" auf Vitamin D brauchbar.

Diät von Kon 19):

Kon sah bei der Evans-Kostform, enthaltend

67,6	g	Vollweizenmehl
15	g	Casein
10	g	Trockenvollmilch
1	g	Kochsalz und
1,5	g	Calciumcarbonat
5	g	Butterfett
sowie		Salat

zunächst gutes Wachstum, das aber in der zweiten Generation aufhörte, wobei Laktationsstörungen eintraten.

Besser war eine modifizierte Steenbock-Diät aus:

70 %	Vollroggenmehl
15 %	Leinsamenkuchen
6 %	Casein
5 %	Butterfett
3 %	gedämpfte getrocknete Ochsenleber
0,5 %	Calciumcarbonat
0,5 %	Kochsalz
10 %	Vollmilchtrockenpulver
1	Schnitte Karotten pro Tag,

die gutes Wachstum, aber auch unbefriedigende Laktation ergab.

Diät nach Hartwell 20):

Im Gegensatz zu allen beschriebenen Kostformen gibt Hartwell eine synthetische Mischung an. Bisher erzielte man damit nur mäßige Erfolge, doch scheint die vorliegende die anderen zu übertreffen (Gewicht der Jungen mit 21 Tagen 28 g).

Casein	20 g
Kartoffelstärke	64 g
Butter	12 g
Salzgemisch	4 g
Marmite-Hefeextrakt . .	5 g
Wasser	300 ccm

(während der Laktation gibt man 10 g Marmite).

Der Vorteil dieser Kost liegt vielleicht in ihrem hohen Wassergehalt. Sie wird hergestellt durch Mischen des Caseins mit der Stärke unter Zusatz von Marmite und Butter. Man gibt weiter auf 40° angewärmtes Wasser hinzu (auf 22 g Casein 65 ccm Wasser) und erhitzt in einem Topf unter starkem Rühren bis die Masse steif wird. Die Vitamine werden durch die kurze Erhitzung nicht zerstört.

Wir selbst verwenden neben den angegebenen für besondere Zwecke noch eine Kost aus ½ Vollweizen und ½ Vollmais gequetscht mit Vollmilch ad lib. unter zweimal wöchentlichen Zulagen von Gemüse (Kohl, Karotten, Rüben). Außerdem erhalten die Tiere geröstete Brötchen oder geröstetes Weißbrot täglich. Wir haben damit außerordentlich gute Zuchtergebnisse erzielt. Jungtiere dieser Zucht sind mit 21 Tagen etwa 27 g schwer. Allerdings haben die Tiere solche Reserven an Vitamin B_2, daß sie für entsprechende Versuche nicht zu gebrauchen sind.

---

19) Kon, Lancet 1931, 779.
20) Hartwell, Biochemic. J. 27, 146 (1933).

4. Zuchtdiäten für Mäuse 20 a)

Wie bei den Ratten spielt die Ernährung der Versuchsmaus für den Ausfall einer Testmethode eine ausschlaggebende Rolle. Die Haltung und Züchtung der Maus ist ohne Erfahrung recht schwierig, vielfach weil man allzu leicht geneigt ist, die Zuchtdiäten für die Ratte einfach auf die Maus zu übertragen. Die Maus muß aber individuell behandelt werden. Sie hat ganz andere Nahrungsbedürfnisse als die Ratte.

Die Beardsche Kost für Zuchtmäuse, die aus

Casein, techn.	31 %
Stärke	38 %
Crisco	21 %
Osborne-Salzgemisch . .	7 %
Lebertran	3 %

und 100 mg Trockenhefe pro Tag/Tier

besteht, ermöglicht zwar gutes Wachstum, liefert aber schlechte Zuchtergebnisse. Bedeutend verbessert wird sie durch Zugabe von Salat (Vitamin E ?).

Vogt-Möller gibt neuerdings eine Kost an, mit der man sehr gute Ergebnisse erzielen soll. Sie besteht aus

Weizen, ganz gemahlen .	55 %
Reiskleie	5 %
Casein.	18 %
Milchpulver (Vollmilch) .	12,5 %
Butterfett	7 %
Kochsalz	1 %
Calciumcarbonat	1,5 %

dazu während der Laktation 3 g Hefe pro Tier/Woche.

Die damit gefütterten Mäuse sind gegen Infektionen usw. viel resistenter als andere. Wachstum und Reproduktion sind ausgezeichnet. Schlechte Erfahrungen machte Vogt-Möller mit einer Kost, die 50 % Weizenkleie, 50 % Magermilchtrockenpulver, Salatblätter und Spratts C. L. O. Puppie Biscuits enthielt, da viele Tiere an Durchfall eingingen.

Wir geben Weizen (ganz gemahlen), Hafer (ganz gequetscht) 1 : 1, Krabbenschalen (getrocknet), hart geröstetes Weißbrot und Gemüse, dazu Hundekuchen und kleine Keks aus Milchpulver, Stärke, Lebertran, Salze und Hefe.

Der Eiweißbedarf der Maus liegt höher als der der Ratte. Er ist mit etwa 31 % der Kost zu veranschlagen. Der Salzbedarf wird erst mit 7 % gedeckt.

Analyse von Spratts Hundekuchen (Spratts Patent Ldt., 24/5 Fenchmach Str., London E C 3)

Wasser 9,65 %, Asche 2,65 %, Rohfaser 0,6 %, Fett 4,83 %, Protein 20,7 %, Kohlehydrate 61,56 %.

20a) Bing-Mendel, J. Nutrit. 2, 49 (1929/30). — Freudenberg-Cerecedo, J. of biol. Chem. 94, 207 (1931). — Beard, Amer. J. Physiol. 75, 645, 658, 668, 682 (1926). — Hubbel-Mendel, J. of biol. Chem. 75, 657 (1927). — Bing-Adam c. s., J. Nutrit. 5, 571 (1932). — Smith c. s., in Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth., Abt. IV, Teil 13, Heft 2, S. 117. — Roberstson c. s., Chemical Basis of Growth usw. Philadelphia 1923. — Thompson, Amer. J. Physiol. 77, 140 (1926). — Gudjonsson, Hosp.tid. (dän.) 73, 733 (1930). — Vogt-Möller, Reaktionen mellem B Vitaminerne og Ernearingens Indhold. Kopenhagen 1934.

5. Das Futter größerer Versuchstiere

Kaninchen und Meerschweinchen erhalten im Sommer frisches Gras, Klee und etwas Hafer, im Winter Heu, Hafer und Rüben evtl. Wasser. Bei Versuchen ist die verschiedene Ernährung zu berücksichtigen.

Hühner und Kücken werden mit Korn und Mais evtl. Küchenabfällen ernährt. Den Tieren muß stets frisches Wasser zur Verfügung stehen. Eine vollwertige künstliche Zuchtdiät für Hühner ist folgende:

Casein, roh	25 %
Dextrin	38 %
Butter	15 %
Salzgemisch	5 %
Agar-Agar	2 %
Trockenhefe	2 %
Filterpapier	15 %

Tauben erhalten Mais und Korn und frisches Wasser. Auch Reis unter Zusatz von Hefe ist lange Zeit vollwertig. Auch künstliche Kostformen sind im Gebrauch, wie z. B.

Casein, roh	22 %
Zucker	10 %
Stärke	27 %
Agar-Agar	2 %
Salzgemisch	3 %
Butter	30 %
Trockenhefe	6 %

6. Die chemische Zusammensetzung der verwandten natürlichen Kostmischungen 21)

Als Hauptbestandteile einer Diät kommen Korn (Weizen, Hafer, Mais) Reis, Leguminosen, grünes Gemüse, sowie Fleisch und Milch in Frage. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die chemische Zusammensetzung der wichtigsten Getreidearten und Hülsenfrüchte.

Tabelle 3. Zusammensetzung der Getreidearten und Hülsenfrüchte in runden Mittelzahlen in Prozenten 20b)

Fruchtart	Wasser	Protein	Fett	Zucker u. Stärke	Asche	Rohfaser
Weizen	13	12	1,5—2	69	2	2—2,5
Roggen	13	12	1,5—2	69	2	2—2,5
Gerste	13	10	2	68—69	2,5	4,5
Hafer	13	10	5	59	3	10
Mais	13	10	5	68	1,5—2	2—3
Reis (enthülst) . . .	12	8—8,5	1—2	75—78	0,5—1,5	0,5—1
Buchweizen	13	11—12	2,5	59	2,5	11,5
Bohnen (Vicia) . . .	14	26	1,5	47	3	8
Bohnen (Phaseolus) .	11	24	2	55	4	4
Erbsen	14	23	2	53	3	5
Linsen	12	26	2	53	3	4
Sojabohnen (gelb) . .	10	34	19	27 (Saccharose)	5	5
Lupinen (gelb) . . .	15	38	4	25	3,5	14

20b) Chem. Zbl. 1925 II, 96, 192.
21) Tillmans, Lebensmittelchemie.

Eine weitere Tabelle gibt Auskunft über die Zusammensetzung der Mehle und Stärkearten.

Tabelle 4. Die mittlere Zusammensetzung in Prozenten der Mehl- und Stärkearten ist in runden Zahlen etwa folgende:

	Wasser	N-Substanz	Fett	Stärke u. Zucker	Rohfaser	Asche
Weizenmehl (fein) . .	12—13	12	1	74—75	0,3	0,5
Roggenmehl(gewöhnl.)	13	10	1	74	1	1
Gerstenmehl	12—13	12	2,5	71	0,75	1,5—2
Hafermehl	10	14,5	6,5—7	66,5	1	1,5
Maismehl	13	10	3	72	1,5	1
Reismehl	12	7,5	0,5	79	0,1	0,5
Buchweizenmehl . .	14	8	2	74—75	0,5—1	1
Bohnenmehl	10—11	23	2	59	1,5—2	3
Erbsenmehl	11	26	1,5—2	57	1	3
Linsenmehl	11	26	1,5—2	57	2	2,5
Weizenstärke	14	1	0,2	84	0,2	0,5
Maisstärke	13	1	Spur	85	Spur	0,4
Kartoffelstärke . . .	18	1	Spur	80—81	Spur	0,5
Tapiokastärke . . .	14,5	0,75	0,2	84	Spur	0,2
Kartoffelwalzmehl . .	10	7	0,25	79	1,5—2	2,5
Weizengrieß	13	11	1,5	73	0,5—1	0,5—1
Maisgrieß	11	9	1	78	0,5	0,5

Weizen enthält etwa 1,9—2% Asche, die sich wie folgt verteilt:

Ca 0,09 %
K 0,476 %
S 0,204 %
Mg 0,184 %
P 0,331 %
Fe 0,005 %

Weizenkleie enthält etwa:

Saccharose 1,64 %
Dextrin 4,19 %
Stärke 13,39 %
Pentosane 27,58 %
Protein 17,00 %
Fiber 9,37 %
Fett 7,07 %
Asche 7,27 %

Die Asche der Weizenkleie besteht aus:

Ca 0,12 %
Mg 0,511 %
K 1,217 %
Na 0,154 %
P 1,215 %
Cl 0,09 %
S 0,247 %
Fe 0,0078 %

Vom gesamten Weizenkorn sind etwa 83,5% Endosperm, 15% Kleie und nur 1,5% Embryo.

Die Kohlenhydrate der Getreide- und Leguminosenarten bestehen zum größten Teil aus Stärke, nur in der Sojabohne finden sich große Mengen Saccharose. Das Weizeneiweiß enthält vier verschiedene Proteine:

Leukosin (Albumin) 5%
salzlösliches Globulin . . . . 10—20%
alkohollösliches Prolamin (Gliadin) . . . . 35—50%
alkohol- und salzunlösliches Glutenin . . . . . 25—50%

Gliadin und Glutenin sind die Hauptbestandteile des Weizenklebers. Gliadin enthält kein Glykokoll und kein Lysin, dagegen viel Glutaminsäure, Prolin und Ammoniak. Glutenin hat viel weniger Prolin und Ammoniak, dafür aber die im Gliadin fehlenden Bestandteile.

Hafer ist von allen Kornarten am fettreichsten. Mais verhält sich ebenso. Hafer enthält zwei Proteine, ein alkohollösliches und ein salzlösliches. Das Avenin ist ein Gemisch beider. Es zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Leucin aus. Bemerkenswert ist der hohe Schwefelgehalt der Haferproteine. Glutenin ist scheinbar im Hafer nicht vorhanden. Der Haupteiweißkörper des Mais, das Zein, ist minderwertig, da Tryptophan, Lysin und Glykokoll fehlen. Teilweise wird dieser Mangel durch das Glutenin des Mais ausgeglichen. Reis enthält zur Hauptsache ein Glutenin (alkohollöslich), das Oryzenin, daneben kleine Mengen Albumin und Globulin.

Die Hülsenfrüchte sind wie die Getreidefrüchte fettarm. Dagegen ist der Aschegehalt höher als bei diesen. Besonders sind Calcium und Kalium stärker vertreten, während sie weniger Phosphor enthalten. Der Haupteiweißstoff der in Frage kommenden Phaseolusbohne, deren Samen (als weiße Bohne) auch für die menschliche Ernährung wichtig ist, ist das Phaseolin. Daneben kommen kleine Mengen Vicellin (Globulin) und Legumelin (Albumin) vor. Bemerkenswert ist der hohe Argingehalt dieser Proteine (beim Phaseolin 4,9 %). Das Globulin der Bohne enthält bedeutend weniger Tyrosin als das der Getreidearten. Die Sojabohne ist durch einen hohen Fettgehalt ausgezeichnet. Der Proteingehalt ist ebenfalls größer. Der Haupteiweißstoff ist das Globulin Glycinin, mit hohem Argingehalt (Pflanzencasein!).

Grüne Gemüse werden bei der Tierhaltung nicht nur als Träger der Vitamine verfüttert, sondern ebensosehr als Ergänzung der unterwertigen Proteine und der Mineralien. Die Zusammensetzung der wichtigsten Gemüsearten geht aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle 5

Art des Gemüses	Wasser	N-Substanz	Fett	Kohlehydrate	Rohfaser	Asche
Weißkohl	92,11	1,52	0,15	4,17	1,17	0,88
Rotkohl	91,61	1,67	0,17	4,78	1,05	0,72
Wirsing	89,60	2,66	0,45	5,02	1,07	1,20
Blumenkohl	90,89	2,48	0,34	4,55	0,91	0,83
Grünkohl	80,50	4,90	0,89	10,28	1,87	1,56
Spinat (Blätter) . . .	93,34	2,28	0,27	1,74	0,50	1,87
Schnittbohnen . . .	89,06	2,62	0,19	6,30	1,15	0,68
Wachsbohnen	92,61	1,77	0,16	3,85	0,99	0,61
Spargel (geschält) . .	95,34	1,64	0,11	1,74	0,63	0,54
Tomaten	93,42	0,95	0,19	3,99	0,84	0,61
Gurken (geschält) . .	97,66	0,55	0,17	0,89	0,30	0,43
Kopfsalat	94,88	1,42	0,28	1,88	0,64	0,90
Endiviensalat	94,13	1,76	0,13	2,58	0,62	0,78
Feldsalat	93,41	2,09	0,41	2,73	0,57	0,79
Möhren	86,77	1,18	0,29	9,06	1,67	1,03

Über die Proteine der Gemüse ist nicht viel bekannt. Nur so viel steht fest, daß in ihnen Eiweißarten vorkommen, die in vielen Getreidearten fehlen und daß sie als Ergänzung dieser minderwertigen Proteine eine nicht unerhebliche

Rolle spielen. Die Kohlehydrate bestehen zur Hauptsache aus Glucose und Fructose. Daneben finden sich Cellulose und Pentosane. Gemüseaschen sind reich an Kalium und Magnesium. Viele Gemüse enthalten reichlich Eisen (Kopfsalat), daneben finden sich Phosphorsäure, Schwefelsäure und Chlor.

Das Fleisch enthält die hochwertigsten Proteine. Seine Zusammensetzung geht aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle 6. Chemische Zusammensetzung des Fleisches

Wasser	70—75 %
Proteine Muskelwand (Sarkolemma, Stroma)	13—18 %
Bindegewebe (leimgebend)	2— 5 %
Fett (zwischen den Muskelfasern abgelagert)	0,5—3,5 %
Asche	0,8—1,8 %

Eiweiß aus Ochsenmuskel besteht aus: 2,1 % Glykokoll, 3,7 % Alanin, 0,8 % Valin, 11,7 % Leucin, 3,2 % Phenylalanin, 2,2 % Tyrosin, 5,8 % Prolin, 4,5 % Asparaginsäure, 15,5 % Glutaminsäure + Tryptophan, 7,5 % Arginin, 7,6 % Lysin, 18%, Histidin, 1,1 % Ammoniak.

Fleischasche ist zur Hauptsache Kaliumphosphat. Fleisch enthält wenig Kohlehydrate, Pferdefleisch mehr als andere Fleischarten.

Gelatine zeichnet sich durch einen besonders hohen Gehalt an Glykokoll aus. Dagegen fehlen Cystin, Tyrosin und Tryptophan, auch Glutaminsäure ist nur in geringer Menge vertreten.

Milch hat im Mittel folgende Zusammensetzung:

Wasser	88 %
Casein	2—2,5 %
Albumin und Globulin	0,5 %
Asche	0,75 %
Reststickstoffsubstanz	0,3 %
Fett	2,8—3,5 %
Milchzucker	4—5 %

Der Haupteiweißkörper der Milch ist das Casein, es besteht aus folgenden Aminosäuren 22):

Tabelle 7

Glykokoll	0 g	Phenylalanin	3,5 g
Alanin	0,9 g	Tyrosin	4,5 g
Valin	6,69 g	Tryptophan	2,0 g
Leucin	7,92 g	Histidin	2,6 g
Isoleucin	1,43 g	Arginin	4,8 g
Serin	0,43 g	Lysin	5,8 g
Asparaginsäure	1,2 g	Ammoniak	1,8 g
Glutaminsäure	10,77 g	Cystin	+
Prolin	6,7 g	Oxyprolin	0,23 g

Bemerkenswert ist das Fehlen des Glykokolls. Die Milch enthält 0,75 % Asche, die aus:

22) Vgl. auch Vickery-White, J. of biol. Chem. 103, 415 (1933).

Tabelle 8

Kali	24,65 %	Eisenoxyd	0,29 %
Natron	8,18 %	Phosphorsäure	26,28 %
Kalk	22,42 %	Schwefelsäure	2,52 %
Magnesia	2,5 %	Chlor	13,95 %

besteht.

Tabelle 8a. Analysen von Trockenmilch

Vollmilchtrockenpulver		Magermilchpulver	
Protein	25,1 %	Protein	33,6 %
Fett	26,8 %	Fett	1,1 %
Zucker	37,0 %	Zucker	53,1 %
Asche	5,8 %	Asche	8,2 %
		Wasser	4,0 %

Zusammenfassend ergibt sich:

Tierische Albumine enthalten kein Glykokoll, pflanzliche Albumine dagegen etwas Glykokoll. In letzteren ist ferner der Gehalt an Glutaminsäure erheblich höher als in ersteren. Tierische Globuline unterscheiden sich wenig von den tierischen Albuminen. Pflanzliche Globuline unterscheiden sich von den tierischen durch einen höheren Gehalt an Arginin und Glutaminsäure. Pflanzliche Albumine und Globuline enthalten wenig Tyrosin. Die Gliadine zeichnen sich durch einen bemerkenswert hohen Gehalt an Ammoniak, Prolin, Glutaminsäure und Tyrosin aus. Casein enthält außer Glykokoll alle Aminosäuren, Gelatine viel Glykokoll, aber kein Cystin, Tyrosin und Tryptophan.

7. Über Einzelbestandteile der künstlichen Diäten

Casein. Während in den Zuchtdiäten das Casein in roher Form Verwendung finden kann, muß es in den Testdiäten erst einer Reinigung unterworfen werden. Zu diesem Zweck geht man am besten nicht vom käuflichen Casein aus, sondern stellt es sich selbst her. Man versetzt abgerahmte Milch mit verdünnter Essigsäure bis zur optimalen Ausflockung und filtriert das Casein durch Gaze ab. Der Niederschlag wird wieder in verdünnter Natronlauge gelöst und erneut durch Säurezusatz gefällt. Das Casein wird nun tagelang mit verdünnter Essigsäure gewaschen, wobei täglich das Wasser gewechselt wird. Man rührt die Mischung, die dünnflüssig sein soll, mehrmals am Tage um. Schließlich wird das Casein abfiltriert und in Alkohol suspendiert. Nach längerem Stehen filtriert man ab, trocknet mit stärkerem Alkohol, dann mit Äther und extrahiert das Casein erschöpfend mit Äther im Soxleth. Das so vorbehandelte Casein wird erst an der Luft, dann 24 Stunden lang bei 100° getrocknet. Man kann es weiter in flachen Schalen ausbreiten und 24 Stunden lang an der Luft auf 120° erhitzen.

Funk und Macallum **22a)** extrahieren das Casein 6 Stunden mit 95 %igem Alkohol. Nach Drummond **22b)** genügt die Behandlung aber nicht. Es muß mindestens zweimal je 6 Stunden bei 60° mit Alkohol und dann weiter 6 Stunden mit Äther behandelt werden. Absolut vitaminfreies Casein ist schwer herzustellen. Namentlich die Vitamine A und B_2 werden hartnäckig festgehalten.

22a) Funk, c. s. Z. physiol. Chem. 1914.
22b) Drummond, Biochemic. J. 16, 10 (1889).

Ein Ersatz des Caseins in der Kost durch Eiereiweiß ist auf die Dauer ungenügend (Boas 23)) (vielleicht wegen Mangel an Lysin ?). Die Verwendung von Casein, das durch die Erhitzung eine bräunliche Farbe angenommen hatte, führt leicht zu Durchfall, namentlich bei Mäusen (Vogt-Möller).

Fett. Als Fett verwendet man Butterfett, das man aus bei niederer Temperatur geschmolzener und filtrierter Butter herstellt. Sehr günstig sind auch die Erfahrungen mit gehärteten Ölen wie Arachisöl oder anderen, da sie fast vitaminfrei sind. Man erhitzt sie vor Gebrauch einige Stunden unter Durchleitung von Luft. Nach Hartwell (l. c. 20) ist Schweineschmalz in einer synthetischen „stock“-Diät besser als Butter. Gute Erfahrungen liegen mit gehärtetem Baumwollsamenöl (Crisco) vor. Die Fette dürfen allerdings nicht total hydriert sein, da nach Evans und Burr 24) ungesättigte Säuren (Linolsäure) zum Wachstum nötig sind.

Kohlehydrate. Bei Verwendung von Kornstärke ist auf Vitaminfreiheit zu achten. Namentlich Kartoffelstärke kann Vitamin B_2 enthalten. Am besten ist Mais- oder Reisstärke. Vollkommen vitaminfrei ist Rohrzucker. Die Verabreichung der Stärke geschieht öfter als Dextrin. Man erhitzt sie nach Befeuchten mit Wasser im Drucktopf oder Autoklaven mehrere Stunden, trocknet und pulverisiert (Palmer-Kennedy 25)).

Salze. Von größter Bedeutung für das Gelingen eines Versuchs ist die richtige Zufuhr der Salze. Man gibt am besten künstliche Mischungen, die der Körperasche oder Milchasche nachgeahmt sind. Sie enthalten alle für das Tier nötigen Elemente. Die bekanntesten Zusammenstellungen sind:

Osborne-Mendel-Salzmischung 26)

Calciumcarbonat	134,8
Natriumcarbonat	34,2
Phosphorsäure	103,2
Schwefelsäure	9,2
Zitronensäure	111,1 + 1,5 Wasser
Ferricitrat	6,34 + 1,5 Wasser
Kaliumjodid	0,02
Natriumfluorid	0,248
Kaliumaluminiumalaun	0,0245
Magnesiumcarbonat	24,2
Kaliumcarbonat	143,3
Salzsäure	53,4
Mangansulfat	0,079

Die Salzmischung wird hergestellt durch Mischen obiger Säuren und Salze unter Wasserzusatz. Die wäßrige Lösung, die einen Niederschlag enthält, wird auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft und das trockne Salz im Mörser fein zerkleinert.

23) Boas, Biochemic. J. 18, 424 (1924).
24) Evans-Burr, J. of. biol. Chem. 96.
25) Palmer c. s., J. of biol. Chem. 74, 591 (1927); 75, 619 (1927).
26) Osborne c. s., J. of biol. Chem. 34, 131, 1918.

Salzmischung nach McCollum-Simmonds 27):

Kochsalz	0,173
Natriumphosphat, primär. H_2O	0,347
Kaliumphosphat, sek.	0,954
$CaH_4(PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,540
Ferricitrat	0,118
Calciumlactat, krist.	1,3 (enthält 13 % Ca)
Magnesiumsulfat, wasserfrei	0,266

Die Steenbock-Mischungen 28):

Mischung 35:	Kochsalz	1,0
	Calciumcarbonat	1,5
Mischung 32:	NaCl	0,202
	$MgSO_4$, wasserfrei	0,311
	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0,526
	K_2HPO_4	1,115
	$Ca_2H_2(PO_4) 2 \cdot H_2O$	1,116
	Calciumlactat	0,289
	Ferricitrat	0,138

Auch bei einer natürlichen Diät, z. B. auf einer Zuchtkost, ist die Verabreichung von Salz wichtiger als vielfach angenommen wird. Ratten oder Mäuse gedeihen auf einer Getreidekost mit Salzzulage besser als ohne Salz. Meist wird NaCl zugegeben. Die Calciumzufuhr ist aber auf Getreidediäten ebenso wichtig, da sonst leicht Kalkmangelerscheinungen auftreten können.

Vitamine. Eine Diät, mit deren Hilfe man den Vitamingehalt einer Substanz ermitteln will, soll alle anderen Vitamine in ausreichender Menge enthalten.

Vitamin A wird meist in Form von Lebertran oder Butter verabreicht, man achte aber die Güte des Trans und nehme nicht einen beliebigen. Außer Lebertran stehen uns heute verschiedene Konzentrate zur Verfügung, so besonders das Präparat Vogan der I. G. Farben und Merck, das aber auch Vitamin D-haltig ist. Man kann weiter auch die Carotine zugeben. Zu beachten ist, daß das Vitamin A bei unzweckmäßiger Lagerung und bei Vermischen mit fein verteilten Stoffen leicht zerstört wird. Es wird ferner zersetzt, wenn es in der Kost mit gehärtetem Walfischöl oder mit Schweineschmalz, der vorher auf 100^0 erhitzt wurde, gemischt wird. Auf 50^0 erhitztes Schweinefett und ungehärtetes Cocosöl zerstören das Vitamin nicht. Das Vitamin A soll, wenn irgend möglich, getrennt von der übrigen Kost verabreicht werden. (Ein Standardlebertran wird von Squibb Sons, New York City, abgegeben.)

Vitamin B wird meist in Form trockener Brauereihefe verfüttert. Bäckereihefe ist weniger wirksam. Oft ist es nötig, abgetötete Hefe zu nehmen, da sonst die Vitamine im Darmkanal synthetisiert werden. Trockenhefe enthält sämtliche Vitamine der B-Gruppe.

Als B_1-Zugabe dient ein Fullererdeadsorbat oder ein alkoholischer Weizenauszug (Bourquin). Auch Tikitiki-Extrakt aus Reisschalen wird viel benutzt. Neuerdings bringt die I. G. Farben reines Vitamin B_1 in den Handel. Die

27) McCollum c. s., J. of biol. Chem. 33, 55 (1918).
28) Steenbock, J. of biol. Chem. 40, 501 (1919).

Präparate Marmite (The Marmite Food Extrakt Co. Ltd. Mincing Lane House, 59 East Cheap, London EC 30) und Vegex (Vegex Inc., 170 Varick Str., New York City) sind als B_1-Zulage oft ungenügend (!).

Vitamin B_2 wird in Form autoklavierter Hefe (5 Stunden bei 120^0) oder autoklavierter Hefeextrakte verfüttert. Ein reines B_2-Präparat (Flavin) ist unschwer herzustellen.

Sehr vitaminreiche Hefe, die fast allgemein in der amerikanischen Literatur als die beste bezeichnet wird, liefert North Western Yeast Company, 1750 North Ashland Ave., Chikago Ill. (U.S.A.).

Vitamin C gibt man in Form decitrierten Zitronensafts oder als krist. Präparat (Ascorbinsäure). In Ampullen oder Pulverform erhältlich ist das Cebion Merck.

Vitamin D wird in Form des reinen krist. Präparats Vigantol gegeben. Die Zufuhr kann natürlich auch durch Ultraviolett-Bestrahlung der Tiere oder des Futters erfolgen.

Vitamin E muß namentlich bei Wachstumsversuchen zugelegt werden. Meist bedient man sich, wenn ein Konzentrat nicht erhältlich ist, des Weizenkeimöls.

8. Die Form der Fütterung

Die Verfütterung einer Diät soll nie als Pulver erfolgen, da die Tiere dann die Möglichkeit haben, den ihnen zusagenden Bestandteil herauszusuchen. Vielfach wird vorgeschlagen, die Kost mit Wasser in Breiform zu füttern. Eine solche Nahrung bietet aber den Nagewerkzeugen der Tiere nicht genügend Betätigung und ist auf die Dauer ungeeignet.

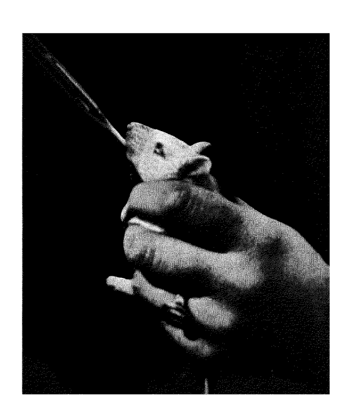


Abb. 15. Pipettenfütterung. (Nach Schultz 29).)

Die zweckmäßigste Form der Fütterung ist die eines Keks. Die Bestandteile werden mit Wasser zu einem Brei von Kuchenbreikonsistenz geknetet, flach ausgewalzt, zu Keks geschnitten und entweder an der Luft getrocknet oder auf einer mit Olivenöl gefetteten Platte leicht gebacken.

Die Vitamine sollen möglichst nicht mit der Kost verabreicht werden. Wäßrige Lösungen werden entweder mit der Sonde gegeben oder aber mit wenig Nahrung angerührt verfüttert. Die Sondendarreichung geschieht in Rückenstrecklage. Die Sonde für Ratten und Mäuse wird an einer Rekordspritze befestigt. Sie besteht aus einem dünnen steifen Catgut- oder Hartgummirohr. Ölige Lösungen werden mit der Pipette verfüttert (s. Abb. 15).

Wasser wird den Tieren in den Windausschen Trinkflaschen gegeben. Sie verhindern ein Verunreinigen und bieten den Tieren stets Trinkgelegenheit. Auch billige Trinkflaschen, z. B. ein oben mit einer Kugel versehenes und durch einen Gummistopfen verschlossenes Glasrohr sind praktisch. Für Mäuse verwenden wir die oben abgebildeten Reagensrohre.

29) Schultz, Z. Kinderheilk. 47, 472 (1929).

Milch wird in Steingutnäpfen verabreicht. Futternäpfe bestehen ebenfalls aus diesem Material. Sie müssen oft gesäubert werden. Wir stellen sie auf das oben abgebildete Sitzbrett. Parsons gibt Futterkästen an, die ein Verstreuen der Nahrung verhindern sollen. Das Futter wird dabei durch ein weitmaschiges Drahtnetz bedeckt.

Als Wasser dient in den meisten Fällen Leitungswasser. Pittenger empfiehlt einen Zusatz von 2 Tropfen Lugolscher Lösung auf 1 Liter Wasser (10 g Kaliumjodid und 5 g Jod auf 100 ccm Wasser). Der Zusatz soll Bakterienwachstum verhüten.

Zeichnung der Tiere

Werden in einem Käfig mehrere Tiere gehalten, ist eine Markierung unvermeidbar. Man kann sie erreichen durch Färbung verschiedener Körperteile (z. B. Rücken, linke Seite, rechte Seite, Bauch, beide Seiten usw.) mit einer wäßrigen oder alkoholischen Lösung von Pikrinsäure. Die Farbe hält sich gut. Auch das Abscheren der Haare an bestimmten Körperteilen kann als Zeichnung benutzt werden.

Ganz sicher ist eine Ohrmarkierung. Sie kann erfolgen durch Stutzen kleiner Ohrstückchen mittels einer scharfen Schere. Der Eingriff ist schmerzlos und unblutig. Die Markierung durch Ohrmarken ist den Tieren viel unangenehmer, aber bei Meerschweinchen und Kaninchen nicht zu umgehen. Hühner, Kücken und Tauben erhalten numerierte Beinringe.

Das Wägen der Tiere erfolgt auf empfindlichen Briefwaagen oder anderen Hebelwaagen. Mäuse werden zu diesem Zweck in kleine Blechkästen gesetzt, deren Deckel mit Luftlöchern versehen ist. Für Ratten gibt es entsprechend größere Kästen.

Spezieller Teil

Die fettlöslichen Vitamine

Das Vitamin A[1]

Durch die Arbeiten von McCollum-Davis und Osborne-Mendel über die Wachstumswirkung der Fette sowie durch die Untersuchungen von McGowan-McNeill, Findlay, Mori, Block und Blegvad über Zusammenhänge zwischen Ernährung und gewissen Augenerkrankungen wissen wir heute, daß viele Fette einen Stoff enthalten, der für die Ernährung höchst bedeutsam ist und dessen Fehlen typische Krankheitserscheinungen hervorruft. Wir bezeichnen diese Substanz mit Vitamin A.

I. Die Avitaminose A[1]

1. Die Symptome des Vitamin A-Mangels

Die Symptome des Vitamin A-Mangels lassen sich in 4 Gruppen teilen:

a) Erscheinungen, die zurückzuführen sind auf degenerative Veränderungen der Haut- und Schleimhautstruktur, wie Keratinisierung und Verhornung des epithelialen Gewebes, verbunden mit Herabsetzung der Resistenz (gegenüber Infekten). Die Erscheinungen äußern sich bei drüsigem Gewebe in einem Versiegen der Sekretion (bei den Tränendrüsen Zersetzung und Infektion des Konjunktivalsekretes, Austrocknung der Kornea, Lidverklebung, Xerophthalmie).

b) Erscheinungen, die auf nervöser Degeneration beruhen (kombinierte Strangdegeneration des Rückenmarks) und sich besonders bei Hunden und Schweinen in Spasmen, Paresen der Hinterbeine und Krampfanfällen äußern.

c) Störungen im Pigmenthaushalt, wie die auf Verlust der Regenerationsfähigkeit des Sehpurpurs beruhende Hemeralopie (Nachtblindheit).

d) Störungen der Sexualsphäre, die denen bei Mangel an Vitamin E gleichen (bei Männchen: Degeneration der Samenkanälchen, Verlust des Keimepithels, bei Weibchen Resorptionssterilität) oder von diesen verschieden sind (Verlust des Geschlechtstriebs, Nichtzustandekommen von Befruchtung und Implantation).

1) Sherman-Smith, The Vitamins. New York 1931. — Browning, The Vitamins. London 1931.

2. Die Erscheinungen der Avitaminose A bei der Ratte

a) Wachstumsstillstand. Bei Ernährung eines Tieres mit einer A-freien Kost ist das erste Zeichen des Vitaminmangels der Wachstumsstillstand. Ratten wachsen nur in der ersten Zeit normal, bis auf der Mangeldiät die A-Reserven des Organismus erschöpft sind. Dann treten Wachstumsstillstand, Gewichtsverlust, allgemeine Schwäche und Appetitlosigkeit ein, die bald zum Tode führen (nutritive Kollapse). Zulage von Vitamin A verhütet die Gewichtsabnahme und ist imstande, normales Wachstum wiederherzustellen.

b) Xerophthalmie. Erscheinungen der Xerophthalmie sind bei Ratten auf einer Vitamin A-armen Kost häufig. Etwa 3—5 Wochen nach Beginn der Fütterung treten pathologische Veränderungen auf, die zunächst darin bestehen, daß den Tieren die Augenwimpern auszufallen beginnen. Die Augenlider sind verfärbt und geschwollen. Die Tiere zeigen eine gewisse Lichtscheu. Nach 5—6 Wochen trübt sich die Kornea, die Sklera zeigt eine auffallende Trockenheit. Absonderungen eines blutig-serösen Sekretes führt zu Verklebungen der Augen. Geschwüre ohne entzündliche Reaktion treten auf und schließlich wird der ganze Bulbus befallen, wodurch es zu dauernder Erblindung kommt. Die histologische Untersuchung bietet das typische Bild der Keratomalacie des Kindesalters.

Schon rein äußerlich sind die Tiere in einem schlechten Zustand. Sie haben ein struppiges Fell und sind viel kleiner als gleichaltrige gesunde. Sie zeigen aber nicht alle Xerophthalmie.

Gudjonsson[2]) sah Xerophthalmie in 97 % der Fälle, eine Zahl, die nicht oft erreicht wurde. Schwellungen und Verfärbungen der Augenlider sind dagegen immer zu sehen. Die Xerophthalmie entwickelt sich bei jüngeren Tieren leichter als bei älteren. Allgemein tritt die Erkrankung einige Tage vor Erreichung des Höchstgewichts auf, in vielen Fällen aber später. Sherman-Storms[3]) sahen Xerophthalmie bei Ratten, die mit 4 Wochen in den Versuch kamen, in 75 % der Fälle. Von älteren Tieren (2—9 Monate bei Versuchsbeginn) entwickelten nur 25 % Xerophthalmie.

c) Resistenzverminderung und andere Erscheinungen der Avitaminose A. Bei der Avitaminose A ist die Empfänglichkeit gegen bakterielle Einflüsse infolge der Epithelveränderungen außerordentlich erhöht. Die Epithelveränderungen erstrecken sich bis in die feinsten Bronchien. Sie konnten nachgewiesen werden in Nasenhöhle, Trachea, submaxillaren und sublingualen Speicheldrüsen, Augendrüsen, Parotis, Nierenbecken, Harnleiter, Blase, Prostata, Samenblase, Pankreas, Genitalorganen usw. Die epitheliale Metaplasie tritt zuerst an Zunge und Nierenbecken auf und führt im Vormagen zu Geschwürsbildungen, Karzinomen. An der Vaginalschleimhaut entwickelt sich eine Kolpokeratose genannte Erkrankung. Typisch ist das Auftreten von Steinen im Verdauungstrakt (Eingeweidegicht der Hühner).

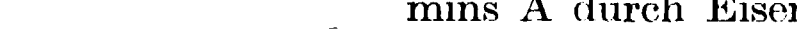
Schädigungen, die auf Infektionsbereitschaft der A-arm ernährten Ratten zurückzuführen sind, wie Störungen der Verdauung, Durchfälle, Erkrankungen des Respirationsapparates, Eiterungen an Nase und Stirnhöhle, sowie Abszesse an der Zungenbasis kommen fast ebenso häufig vor wie die Xerophthalmie

2) Gudjonsson, Acta path. scand. (Københ.) Suppl. 4, 189 (1930) und frühere Arbeiten.
3) Sherman-Storms, J. amer. chem. Soc. 47, 1653 (1925).

selbst. Nervöse Erscheinungen, wie Muskelschwäche und Muskelinkoordination, begleiten die Avitaminose A bei der Ratte ebenso wie die Hemeralopie.

d) Vorstadium der Xerophthalmie. Ein Vorstadium der Xerophthalmie beschreiben Mouriquand-Rollet-Chaix 4). Sie können durch Anwendung eines Binokularmikroskops bei der Ratte die ersten Zeichen der Avitaminose schon nach 20 Tagen feststellen.

e) Salzxerophthalmie wird eine Erkrankung genannt, die mit typischer Xerophthalmie verläuft und sich bei Ratten durch eine Kost mit 5% Butterfett und 0,2% Eisensulfat erzeugen läßt. Die Erscheinung beruht auf oxydativer Zerstörung des Vitamins A durch Eisen.



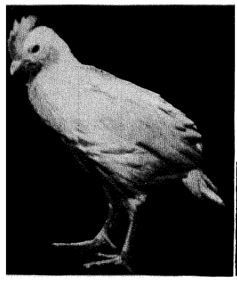




Abb. 16. Rechts im Bild ein Vitamin A-frei ernährtes Kücken, links gleichaltriges gesundes. (Nach Elvehjem.)

3. Die Erscheinungen des Vitamin A-Mangels beim Hühnchen 5)

Werden junge Kücken im Alter von 1 Tag auf eine A-freie Kost gesetzt, so zeigen sie in den ersten 3 Wochen gutes Wachstum. Zwischen der 3. und 4. Woche tritt dann plötzlicher Wachstumsstillstand ein, verbunden mit Gewichtsabnahme (Abb. 17). Die Tiere haben einen schwankenden Gang, machen unkoordinierte Bewegungen und bewegen sich zuletzt überhaupt nur, wenn sie gescheucht werden. Um das Gleichgewicht zu halten, kriechen sie häufig nur auf den Schenkeln. Im vorgeschrittenen Stadium liegen sie auf der Seite, der Kopf fällt vornüber, das Gefieder ist zerknittert und beschmutzt. Schnabel und Schenkel sind farblos (Abb. 16). Der Appetit nimmt nicht ab. Sie kriechen bis zuletzt zum Futternapf, um die Nahrung zu erreichen. Erfolgt keine Zufuhr von Vitamin A, so tritt bei gleichbleibenden Symptomen nach wenigen Tagen der Tod ein.

A-Mangelerscheinungen beim Kücken wurden besonders von Emmett-Peacock, Hart, Steenbock und Mitarbeiter, von Henninger und Hutchinson beschrieben. Auch Hühner entwickeln A-Mangelsymptome (Eingeweidegicht).

Abb. 17. Gewichtskurven Vitamin A-frei ernährter Kücken mit und ohne Lebertranzulage (2% der Kost). Ordinate = Gewicht, Abszisse = Zeit in Wochen. (Nach Elvehjem.)

4. Die Erscheinungen der Avitaminose A beim Meerschweinchen

Simola konnte feststellen, daß auch Meerschweinchen ohne Zufuhr des Vitamins A nach kurzer Zeit das Wachstum einstellen. Am besten werden junge Tiere mit einem Gewicht von 110—140 g benutzt. Auffallend ist bei Meerschweinchen die Erscheinung, daß das Vitamin durch Xanthophyll scheinbar ersetzt werden kann. Die Dosen, die für normales Wachstum nötig sind, liegen erheblich höher als beim Carotin.

4) Mouriquand c. s., Bull. Acad. Méd. 103, 479 (1930).
5) Elvehjem c. s., J. of biol. Chem. 97, 76 (1932). — Kline c. s., J. of biol. Chem. 97, 83 (1932).

5. Die Avitaminose A bei anderen Tieren

Auch andere Tiere erkranken an Xerophthalmie, wie z. B. der Hund. Die „**black-tongue**" ist eine kombinierte Avitaminose, die auch auf Fehlen A-wirksamer Substanzen beruht. Interessant ist die Erscheinung, daß die black-tongue durch Vitamin A nicht zu beeinflussen ist, aber sofort heilt, wenn Carotin gegeben wird.

II. Die Hypervitaminose A 6)

1. Die Erscheinungen der Hypervitaminose A

In großen Dosen ist das Vitamin A bei Ratten und Mäusen toxisch. Die Tiere zeigen Haarausfall, gerötete, geschwollene, verklebte Augenlider und Exophthalmus. Bei der Sektion tritt eine bedeutende Verfettung der Leber

Tabelle 9

Dosierung in Ratteneinheiten		Zahl der Tiere	Befund bei Versuchsende am 12. Tage		
Tagesdosis	Gesamtmenge		Gewichtsdifferenz von Anfangs- und Endgewicht in g bei den einzelnen Mäusen	Durchschnittliche Gewichtsdifferenz in g	Zahl der Toten
250	2500	10	— 1,5 ± + 1 + 0,5 — 0,5 — 4 — 3,5 — 1 — 0,5 — 2	— 1,0	0
500	5000	18	± — 0,5 — 5 ± ± — 2,5 — 0,5 — 1 — 4 + 0,5 + 0,5 + 1 + 1,5 + 0,5 — 1 — 0,5 + 0,5 ±	— 0,6	0
1000	10 000	18	— 3,5 — 1 — 1 — 2 — 3,5 — 3,5 tot 10. Tg. — 1 ± — 1 + 0,5 ± + 0,5 + 0,5 — 2 — 2 — 2 ±	— 1,24	1
2000	20 000	20	— 5,5 — 5,5 — 6,5 tot 7. Tg. tot 7. Tg. tot 7. Tg. — 4 — 4 — 6 — 7,5 tot 11. Tg. tot 8. Tg. — 6 — 5,5 — 5 tot 12. Tg. — 3,5 — 3 tot 10. Tg. — 6	— 5,2	7
4000	40 000	8	tot 8. Tg. tot 11. Tg. tot 8. Tg. tot 12. Tg. tot 7. Tg. tot 8. Tg. tot 10. Tg. — 5,5	—,5	7
8000	40—56 000	4	tot 7. Tg. tot 7. Tg. tot 9. Tg. tot 7. Tg.	—	4
20 000	60—100 000	4	tot 5. Tg. tot 6. Tg, tot 5. Tg. tot 7. Tg.	—	4
20 000	60 000	2	tot 4. Tg. tot 6. Tg.	—	2
20 000	20 000	6	tot 6. Tg. tot 12. Tg. — 5,5 tot 8. Tg. tot 8. Tg. tot 8. Tg.	— 5,5	5
Kontrollen (0,2 ccm Sesamöl täglich)					
		8	+ 1 + 2 — 1,5 + 2 — 1,5 + 1 — 0,5 + 1	+ 0,5	0

6) Drigalski, Klin. Wschr. 308, 1171 (1933). — Moll-Domagk-Laquer, Klin. Wschr. 1933, 465; Arch. f. exper. Path. 1933. — Collazo, Klin. Wschr. 1933. — Bomskov und Mitarbeiter, Z. exper. Med. 1933. — Moore, nach persönlicher Mitteilung.

hervor (Kupffersche Sternzellen). Bei der Hypervitaminose A kann die Lipoidspeicherung in den Endothelien der verschiedensten Organe so hochgradig sein, daß das histologische Bild an die Lipoidspeicherkrankheiten des Menschen erinnert. Überdosierung des Vitamins führt ferner zu einer Mineralverarmung der Knochen mit zahlreichen Spontanfrakturen. Auch wirkt die Hypervitaminose A der rachitisheilenden Wirkung des Vitamins D entgegen. Kaninchen sind gegen die Überdosierung resistent. Das A-wirksame Carotin ist ungiftig.

2. Die Bestimmung der toxischen Grenzdosis des Vitamins A

Die toxische Grenzdosis wird an der Maus ermittelt, weil Mäuse gegen Überdosierung des Vitamins A am empfindlichsten sind. Als Giftgrenzdosis gilt diejenige kleinste Menge, die bei mindestens 4 Mäusen im Gewicht von 18—20 g, nach 10maliger Darreichung eine Gewichtsabnahme von 2,5 g oder den Tod verursacht. Die verabreichte Volummenge darf dabei 0,2 ccm nicht überschreiten, die Darreichung muß mit der Sonde geschehen. Vorstehende Tabelle gibt ein ausführliches Beispiel 7).

Wie daraus ersichtlich, ist bei der Tagesdosis von 1000 RE. von 18 Tieren nur 1 Tier eingegangen, während nur 3 Tiere starke Gewichtsabnahme zeigen. Im Durchschnitt wird eine Abnahme von 2,5 g nicht erreicht. Die Dosen über 2000 RE. sind durchweg toxisch, während die unter 1000 RE. vertragen werden. Der Giftgrenzwert liegt zwischen 1000—2000 RE.

Vogan tötet in Tagesdosen von 4000 RE. mit einer Gesamtdosis von 40000 RE. sicher. Die Berechnung des therapeutischen Index erfolgt aus der Wirksamkeit im Rattentestversuch auf Vitamin A und der an Mäusen ermittelten Giftigkeit.

III. Die Testmethoden auf Vitamin A

A. Versuchstiere und ihre Haltung

1. Ratten

a) Auswahl der Versuchstiere. Das typische Tier für den Vitamin A-Test ist die Ratte. Man verwendet am besten 3—4 Wochen alte Tiere mit einem Gewicht von 35—55 g (Alter in Tagen: 21—28 Tage), da ältere Tiere gegen den A-Mangel nicht so empfindlich sind. In einigen Fällen sind die Ratten schon früher brauchbar. Bei der Auswahl ist das Gewicht weniger wichtig als das Alter (Nelson 8)). Tiere, die auf der Norris-Church-Zuchtdiät 9) gehalten wurden, sind schon mit 28—29 Tagen versuchsreif (vgl auch Sherman-Munsell 10)). In den Laboratorien der I. G. Farbenindustrie und Merck verwendet man Tiere mit einem Gewicht von 35—45 g (Laquer c. s., l. c. 7).

Die Vorschrift der U-S-Pharmakopoe fordert Tiere, die einer bestimmten Zucht entstammen, und die nicht jünger als 25 Tage und nicht älter als 29 Tage sein sollen und nicht unter 35 g und nicht über 45 g wiegen dürfen. Die Forderung ist nicht immer einzuhalten. Wir kennen z. B. Rattenrassen, deren Junge schon mit 25 Tagen 49—53 g schwer sind. Man nimmt in diesem Fall besser 21—23 Tage alte

---

7) Holtz-Laquer c. s., Biochem. Z. 237, 248 (1931). — Moll-Dalmer c. s., Arch. f. exper. Path. 170, 176 (1933).
8) Nelson, Science 68, 212 (1928).
9) Norris c. s., J. of biol. Chem. 89, 589 (1930).
10) Sherman c. s., J. amer. chem. Soc. 47, 1639 (1925).

Tiere im Gewicht von 40—45 g. Alle Würfe werden im Alter von 7 Tagen auf 6 reduziert.

b) Haltung der Versuchstiere. Die Ratten werden in Einzelkäfigen aus Draht oder Glas gehalten. Vorbedingung ist stets die Verhütung der Koprophagie. Die Käfige stehen in einem besonderen Raum, der gut durchwärmt und gelüftet ist. Glaskäfige oder Emailletöpfe werden mit einem Drahtnetzeinsatz als Sitzfläche versehen. Der Boden wird zum besseren Wärmeschutz mit einer Schicht Sägemehl bedeckt, die so weit unterhalb der Sitzfläche liegen muß, daß die Tiere sie mit der Pfote nicht erreichen können.

c) Einteilung der Versuchstiere. Für jede zu prüfende Substanz sind etwa 4—6 Würfe erforderlich. Pro Dosis rechnet man mit 10 Tieren. Man teilt die Würfe in Zehnergruppen ein, von denen die eine als negative Kontrolle dient, während eine als positive Kontrolle mit einem bekannten Standardpräparat behandelt wird. Alle anderen Gruppen erhalten steigende Dosen des zu untersuchenden Präparats. Es ist darauf zu achten, daß die Versuchsgruppen einander möglichst gleichwertig sind. Die Würfe werden so verteilt, daß in jeder Gruppe möglichst ein Tier eines jeden Wurfs vertreten ist. Auch ist auf gleiche Verteilung der Gewichte und Geschlechter zu achten (Coward **12)**).

d) Fütterung der Versuchstiere. Die Tiere erhalten eine der untenstehenden A-freien Diäten und Wasser ad libitum. Verschiedene Autoren bestimmen die täglich gefressenen Nahrungsmengen. Bei Fortschreiten der Avitaminose wird mitunter tagelang die Nahrung verweigert. Wir selbst haben die besten Erfahrungen mit der Sherman-Diät gemacht (Nr. 3).

Von größter Wichtigkeit für den Testversuch auf Vitamin A ist die Zufuhr von Vitamin D. Fehlt dieses Vitamin in der Diät, so erzielt man mit einer Zugabe von Vitamin A überhaupt kein Wachstum. Erst beide Vitamine zusammen ermöglichen normales Wachstum. Ist das eine Vitamin in kleinerer Menge vorhanden als das andere, so wird das Wachstum durch das in der kleinsten Konzentration vorliegende Vitamin begrenzt. Die Zufuhr des Vitamins D kann geschehen:

1. durch Ultraviolettbestrahlung der Tiere oder des Futters **13)**,
2. durch Zufuhr von bestrahltem Ergosterin **14)**.

Bei dem Studium der vor 1923 erschienenen Arbeiten über A-Testversuche ist zu berücksichtigen, daß man damals noch keinen Wert auf genügende Zufuhr des Vitamins D legte **15)**.

In der Fütterungstechnik folgen wir den Angaben von Laquer und Mitarbeitern (l. c. 7): Die einzelnen Futterbestandteile werden vermischt. Zu 1 kg der Mischung gibt man 5 ccm einer mit vitaminfreiem Sesamöl hergestellten Lösung von kristallisiertem Vitamin D in einer Verdünnung des Handelsvigantols von 1 : 300. Die Mischung wird unter Zugabe von Wasser zu einem Brei von Kuchenkonsistenz geknetet. Die Kost muß wegen des Wassergehaltes oft bereitet werden. Die Zufuhr des Vitamins D in der Diät ist so bemessen,

12) Coward, Biochemic. J. 27, 873 (1933).
13) Steenbock c. s., J. of biol. Chem. 59 Proc. — Chick c. s., Biochemic. J. 20, 633 (1926).
14) Leigh c. s., Biochemic. J. 21, 208 (1927).
15) Steenbock c. s., J. of biol. Chem. 56, 355 (1923); 73, 113 (1927); 61, 405 (1924).

daß bei einer Aufnahme von 10 g Futter die Ratte das Doppelte des täglichen Bedarfs bekommt.

Einzelne der unten angegebenen Diäten enthalten Leinsamenmehl. Ein solcher Zusatz ist möglichst zu meiden, da das Mehl eine Substanz, Gossypol, enthält, die dem Wachstum entgegenwirkt. Autoklavieren oder Zugabe von Eisen zerstört diese 16).

e) Die Verabreichung der zu testenden Substanz. Je nachdem man einen prophylaktischen oder einen kurativen Test bevorzugt, wird die zu prüfende Substanz den Tieren bei Beginn des Versuchs oder erst nach einer Vorperiode zugegeben. Die Substanz muß stets getrennt von der anderen Nahrung verabreicht werden. Ölige Lösungen füttert man mit der Pipette oder Sonde. Andere Substanzen werden mit einem kleinen Teil der Kost angerührt. Zugabe der Substanz zur Testdiät ist zu vermeiden, da feinverteilte Stoffe das Vitamin A zerstören können 17).

f) Die Haltung der Zuchttiere. Von größter Bedeutung für den Testversuch auf Vitamin A ist die Diät der Muttertiere. Enthält sie zuviel Vitamin, so haben die Jungen solche A-Reserven, daß sie nur sehr schwer zu schädigen sind und für Testversuche unbrauchbar werden. Das ist der Fall, wenn man eine Kost aus $^2/_3$ Vollmilchtrockenpulver und $^1/_3$ Weizen füttert. Gibt man umgekehrt eine zu vitaminarme Kost, wie z. B. $^1/_6$ Vollmilchtrockenpulver und $^5/_6$ Weizen, sind die Jungen so empfindlich, daß sie schon während der Vorperiode eingehen.

Bewährte Zuchtdiäten für Ratten, deren Junge für den A-Test Verwendung finden sollen, seien im folgenden mitgeteilt 18):

Sherman-Diät (l. c. 10 und 19)): $^1/_3$ Vollmilchtrockenpulver und $^2/_3$ Weizenvollmehl, dazu 30—60 g Fleisch pro Tier/Woche, oder $^1/_3$ Vollmilchpulver und $^2/_3$ Vollweizenmehl, dazu pro Woche 2 % des Weizengewichts an Kochsalz und 10 % an Fleisch.

U-S-Pharmakopoe-Diät: 33 % Vollweizenmehl und 66 % Vollmilchpulver, dazu 1 % des Weizens an NaCl.

Diät von Laquer (l. c. 7):

7 Teile Maisschrot	17,5 %
15 Teile Weizen (voll)	37,5 %
10 Teile Vollmilch	25 %
3 Teile Hafer (voll)	7,5 %
5 Teile Brot	12,5 %
0,03 Teile $CaCO_3$	0,075 %
0,06 Teile NaCl	0,150 %

Das Maismehl wird mit der Milch kurz aufgekocht und die übrigen Bestandteile einschließlich der Körner mit dem Brei zu einer leicht bröckelnden Masse geknetet. Außer dieser Kost erhalten die Tiere eine Zugabe von 2mal 4 g

16) Gallup, J. of biol. Chem. 91, 387 (1931).
17) Marcus, J. of biol. Chem. 90, 507 (1931).
18) Steenbock, Science 58, 449 (1923). — Cady c. s., J. of biol. Chem. 86, 743 (1931). — Sure c. s., J. of biol. Chem. 83, 375 (1929). — Grafe, Handbuch der organischen Warenkunde 5, 51 (1928).
19) Sherman c. s., J. of biol. Chem. 78, 671 (1928). — Osborne c. s., J. of biol. Chem. 60, 5 (1924).

magerem, fettfreiem, gemahlenem Pferdefleisch pro Woche und abwechselnd damit 4mal je 2 g frisches Gemüse (Salat, Kohl) pro Tier und Woche.

Die Diät von Sherman wurde von Laquer verlassen, weil sich herausstellte, daß die Tiere auf der Kost bis zum Versuchsbeginn nur selten das richtige Gewicht erreichen und weil während der Vorperiode zum kurativen Test beträchtliche Tierverluste eintraten. Dieselben schlechten Erfahrungen wurden mit einer modifizierten 20) U-S-P-Diät gemacht, die aus 33 % Weizen, 34 % Maisschrot, 21 % Vollmilchpulver, 2 % getrockneter Leber, 2 % Alfalfa und 7 % Leinsamenöl bestand. Unter Weglassung von Alfalfa und Leinsamen und durch Zugabe von weiteren 2 g Frischleber erhielten die Tiere abnorm hohe A-Reserven, die sie für den Testversuch unbrauchbar machten. Auch bei der Laquerschen Kost empfiehlt es sich nicht, die Zulagen an Milch und Fleisch zu erhöhen. Die Tiere werden dadurch zwar schwerer, aber gegen den A-Mangel auch bedeutend resistenter.

Gudjonsson 21) gibt folgende Diät für Zuchttiere, durch die die Jungen eine so kleine A-Reserve erhalten, daß es möglich ist, sie für den prophylaktischen Test auf das A-Vitamin zu benutzen. Die Diät besteht aus: Magermilchpulver 30 Teile, Reismehl 40, Hefe 15, Cocosnußöl unter Zusatz von 0,3 % Haifischöl 15 Teile. Würfe, die auf dieser Kost erhalten wurden, sind nach A-freier Ernährung schon nach 4 Wochen auch für den kurativen Test brauchbar.

Gudjonsson erzielte mit dieser Zuchtkost gute Ergebnisse. Die Diät war für 10 Generationen genügend (Zuchtergebnis etwa 40 Würfe pro Monat von 100 Muttertieren). Dabei erreichten die Jungen mit einem Alter von 30 Tagen ein Gewicht von etwa 45 g. Bei Verwendung dieser Tiere konnte die Vorperiode des Versuchs auf 4—5 Wochen beschränkt werden. Bessere Ergebnisse wurden erzielt, wenn alle Würfe auf 6 reduziert wurden. Die angegebene Kostform ist unter der Bezeichnung Diät Nr. 4 von G. bekannt.

Auch die von Bacharach beschriebene Kostform für Zuchttiere, deren Junge für den Vitamin-A-Test Verwendung finden sollen, hat sich bewährt. Die Kost besteht aus:

Weizen, ganz gemahlen	70 Teile
Vollmilchtrockenpulver	30 ,,
Marmite	5 ,,
Wasser	45 ,,

dazu 2 g Gemüse pro Tag sowie 1mal pro Woche 2—3 g Fleisch und 2mal pro Woche 2 g Leber oder Fleisch. Die Kost ist eine modifizierte Sherman-B-Diät.

Norris 22) beschreibt eine Kost aus:

1000 g	Weizen (voll gemahlen)
500 g	Trockenvollmilch
75 g	Weizenkeimen
75 g	Trockenhefe
20 g	Kochsalz, jodiert,

mit einer 3mal wöchentlichen Zulage von grünem Salat und einer Zugabe von 3 g magerem Rindfleisch pro Woche. Tiere aus dieser Zucht sind im Alter von 28—29 Tagen für den A-Test brauchbar. Sie entwickeln nach 26—33 Tagen auf einer A-freien Kost Ausfallserscheinungen.

20) Holmes, J. Amer. pharmaceut. Assoc. 20, 6, 588 (1931).
21) Gudjonsson, Biochemic. J. 24, 1592 (1930).
22) Norris, J. of Nutrit. 5, 495 (1932).

Versuche, die standardisierten Zuchtratten zu umgehen, schlugen fehl (Franke 23)). Auch der Vorschlag von Samson-Korenschevsky 24), die Mutter zusammen mit den Jungen vom 16. Tage ab A-frei zu ernähren, ist nicht ideal.

2. Hühnchen (l. c. 5). Einen Tag alte, weiße Leghornkücken werden mit A-freier Diät und Wasser ad libitum ernährt. Die Tiere werden in Käfigen mit Gitterboden gehalten, deren Wände und Deckel ebenfalls aus Drahtgeflecht bestehen. An jeden Käfig angeschlossen ist ein etwa ebenso großer, dessen Wände aber aus Holz oder Blech bestehen, und der ebenfalls mit Gitterboden versehen ist. Dieser Käfig wird konstant elektrisch geheizt. Beide Käfige, die durch eine kleine Öffnung verbunden sind, stehen auf einer verzinkten Metallplatte mit hochgebogenen Rändern, die zum Auffangen der Exkremente dient. Der stabile Holzkäfig ist an drei Seiten mit etwa je 3—4 kreisrunden Öffnungen versehen, durch die ein Kücken eben den Kopf hindurchstecken kann. Außen befinden sich, etwas unterhalb dieser Öffnungen, kleine Krippen aus Metall, die abnehmbar befestigt sind. In diese Krippen wird teils die Nahrung, teils Wasser getan. Die täglich gefütterte Menge wird gewogen. Die ganze Anlage steht auf einem sauberen Holztisch oder auf einer großen Zinkfläche. Die Anordnung der Futterkästen ermöglicht es, die nur außerhalb des Käfigs verstreute Nahrung zu sammeln und so den wirklichen Nahrungsbedarf der Tiere festzustellen.

Auch 6 Wochen alte Kücken entwickeln auf A-freier Diät Mangelsymptome, doch treten die Erscheinungen der Avitaminose erst später ein.

3. Meerschweinchen. Die Erzeugung einer Avitaminose A beim Meerschweinchen ist schwierig, da die Tiere nur selten die A-freie Kostmischung fressen. Die Meerschweinchen zeigen keine Augenveränderungen, sondern lediglich Gewichtsstillstand und Gewichtsabnahme. Auch die bei der Sektion gefundenen Veränderungen weichen in manchen Fällen von denen der Ratte ab.

Für den Meerschweinchenversuch nimmt man am besten 4—6 Wochen alte Tiere, die zunächst mit einer butterhaltigen Kost gefüttert werden. Dabei ist es nötig, sie zum Fressen anzulernen. Nur Tiere, bei denen dies gelingt, sind für den Versuch brauchbar. Nachdem man sie etwa 4 Wochen auf dieser Kost gehalten hat (bis sie etwa 550—560 g schwer sind), wird die Butterzulage durch Schweineschmalz ersetzt und die Zitronensaftzulage, die während der Vorperiode 20 ccm täglich betrug, auf 4 ccm reduziert. Die Tiere nehmen gewöhnlich noch auf 600 g zu, erst dann tritt Gewichtsstillstand ein. Die Überlebensdauer der Tiere beträgt 66 bis 110 Tage.

B. Vitamin A-freie Kostformen

1. Allgemeines

Zwei Schwierigkeiten ergeben sich bei der Auswahl einer A-freien Testdiät. Die erste ist die, daß die Tiere nur schwer von ihren A-Reserven zu befreien sind und nicht aufhören zu wachsen. Die „run out time", wie die Amerikaner sie nennen, ist zu lang. Zweitens ist die Ansprechbarkeit auf eine gegebene Vitamindosis bei den verschiedenen Kostformen verschieden und weiter auch bei derselben Kost unter den einzelnen Tieren schwankend.

Bei der Zusammenstellung einer A-freien Kost ist vor allem darauf zu sehen, daß sie außer dem fehlenden Vitamin alle anderen, für die Ratte nötigen, enthält. Über die Zufuhr des Vitamins D ist bereits das Nötige gesagt. Neben diesem ist aber die Zufuhr der Vitamine der B-Gruppe ausschlaggebend. Meist verabreicht man sie in Form von Hefe, die vor Gebrauch erschöpfend mit Äther extrahiert wird, um Spuren des Vitamins A zu entfernen. Die Zufuhr von

23) Franke, Ber. Physiol. 69, 499 (1933).
24) Samson-Korenschevsky, Biochemic. J. 26, 322 (1932).

Vitamin C ist bei der Ratte unnötig. Beim Meerschweinchen wird man heute auf die reine Ascorbinsäure zurückgreifen.

Ein Fettgehalt der Kost ist nach Laquer (l. c. 7b) möglichst zu vermeiden. Die Tiere müssen so stark sein, daß sie auch ohne Fettzufuhr während des Versuchs wachsen. Auch Bacharach stellte fest, daß ein Fettgehalt der Kost auf den Ausfall des Versuchs ohne Einfluß ist 25). Dagegen scheint die Anwesenheit von Fett für die Resorption von Carotin wichtig. Ahmad 26) zeigte, daß zugeführtes Carotin bei Abwesenheit von Fett nur zu 10% resorbiert wird, während die Aufnahme bei Fettangebot nahezu quantitativ war.

Für den Versuchsverlauf ist es ferner gleichgültig, ob die Kohlehydrate als Stärke oder Dextrin verabreicht werden. Demgegenüber scheint aber die verwandte Caseinform für das Testergebnis von größerer Bedeutung zu sein. Culhane 27) gibt an, mit alkalibehandeltem Casein leichter Xerophthalmie erzeugen zu können als mit gewöhnlichem. Coward 28) hat gezeigt, daß man mit hochgereinigtem, vitaminfreiem sog. „Glaxo Casein", wenn die Ratten aufhören zu wachsen, durch A-Zulage das Wachstum nicht in Gang bringen kann oder aber, daß die Reaktion auf verschiedene Dosen fast gleich ist. Wurde in derselben Kost das Casein durch weniger gereinigtes sog. „light white Casein" ersetzt, gelang die Auswertung steigender Dosen ohne Schwierigkeit. Es hat also den Anschein, daß im hochgereinigten Casein ein Stoff fehlt, der außer der A-Wirkung vorhanden sein muß, damit Wachstum eintreten kann. Bacharach (l. c. 25) konnte allerdings die Befunde bei einem Vergleich zweier Diäten mit den beiden Caseinsorten mit oder ohne Fettzulage nicht bestätigen. Er empfiehlt für Testversuche eine fetthaltige Kost mit Glaxo Casein (vgl. auch Moore 29)).

Culhane l. c. 27) verglich zwei Kostformen mit light white Casein und hochhochgereinigtem, erhitztem und extrahiertem Casein. Danach enthält das light white Casein etwas Vitamin A, weil Tiere, die damit gefüttert wurden, viel langsamer und eine viel weniger schwere Xerophthalmie entwickelten, als auf der anderen Kost. Dementsprechend waren auch die Dosen, die zur Heilung der Xerophthalmie oder zu Wachstumssteigerung führten, in beiden Fällen außerordentlich verschieden. Während auf der light white Casein Kost schon sehr kleine Mengen genügten, waren schon viel größere Dosen erforderlich, um eine Reaktion auf der anderen Kost auszulösen. Die Cowardsche Kost mit light white Casein enthielt kein Fett, während die andere etwa 10% gehärtete Pflanzenöle hatte. Die fettfreie Kost rief Hautveränderungen hervor, selbst bei einer Hefezulage von 8%.

Es ist unbedingt nötig, bei einem Vergleich der in der Literatur niedergelegten Werte auf die Kostform zu achten. Auswertungen mit verschiedenen Kostmischungen sind nur schwer vergleichbar.

2. Vitamin A-freie Diäten für Ratten

Die nachstehend aufgeführten Kostmischungen für Ratten sind stets aus gereinigten Nährstoffen herzustellen. Fehlt bei der betreffenden Diät aus irgendeinem Grunde die Angabe des Reinigungsverfahrens, ist zweckmäßig,

25) Bacharach, Ber. Physiol. 72, 70 (1933).
26) Ahmad, Biochemic. J. 25, 1195 (1931).
27) Culhane, Ind. Engin. Chem. 51, 259 (1932).
28) Coward, Biochemic. J. 23, 695 (1929).
29) Moore, Meeting, Brit. Ass. 116 (1932).

nach den unter Nr. 1 und 2 angegebenen Methoden vorzugehen. Die beiden Kostformen 1 und 2 zeigen die verschiedenen Typen der fettfreien und fetthaltigen Diät. Die Salzmischungen sind einmal der Milchasche, zweitens der Körperasche nachgeahmt.

Nr. 1 (Osborne-Mendel **30)**, Coward, l. c. 12).

Casein	18%
Stärke	76%
Salzgemisch	4%
Hefe	2%

Das Casein (aus Kuhmilch) wird 24 Stunden lang in flachen Schalen auf 102° erhitzt. Man extrahiert darauf erschöpfend mit Alkohol und Äther im Soxleth. Funk **31)** empfiehlt eine Alkoholextraktion in der Wärme und eine Behandlung mit Oxydationsmitteln, die das Vitamin A schnell zerstören. Potter **32)** erhitzt in flacher Schicht 7 Tage lang im elektrischen Ofen auf 110°. Als Stärke dient Reisstärke, die ebenso behandelt wird. Die trockene Brauereihefe wird mit Äther extrahiert. Das Salzgemisch ist das Osborne-Mendelsche (l. c. 26). Die einzelnen Teile der Diät werden gemischt, mit Wasser zu einem Brei von Kuchenbreikonsistenz geknetet und flach ausgewalzt getrocknet.

Nr. 2 (Drummond, l. c. 44, v. Euler, c. s. l. c. 46, Kuhn, c. s. **33)**).

Casein	20%
Dextrin	15%
Reisstärke	35%
Arachisöl, gehärtet	15%
Vitox (Marmite)	10%
Salzgemisch	5%

Das Casein wird mit Methanol heiß extrahiert und darauf 24 Stunden lang auf 120° erhitzt. Die Reisstärke wird ebenso behandelt. Das Arachisöl wird 8 Stunden bei 150° durchlüftet. Die Kost wird wie oben hergestellt. Außerdem erhalten die Tiere je 2 klin. E. Vigantol pro Woche. Das Salzgemisch ist das McCollum-Simmondsche **34)**.

Bemerkungen zu nebenstehender Tabelle. Zu Nr. 3: Die Kost ist nach den Erfahrungen von Laquer und nach unseren eigenen für den kurativen Wachstumstest am geeignetsten. Die einzelnen Bestandteile werden wie unter 1 und 2 gereinigt, gemischt und mit etwa 70 ccm Wasser für 100 g geknetet. Man legt 0,05 % bestrahltes Ergosterin zu. Russell (l. c. 36) bestrahlt die fertige Mischung mit Ultraviolett (UV). Man kann den Zusatz von Ergosterin oder die UV-Bestrahlung der Kost umgehen, wenn man nur 9,9 % Hefe zulegt und die restlichen 0,1 % erst nach UV-Bestrahlung. Sherman-Munsell (l. c. 37) gaben 1925 eine ganz ähnliche Kost an, die 20 % Casein, 70 % Stärke und 5 % Hefe enthielt. Sie wurde vor der Verabreichung UV bestrahlt. Das Casein wurde mit 90 %igem Alkohol bei 80° 3mal 1 Stunde zum Sieden erhitzt (200 g Casein auf 500 ccm Alkohol), dann bei 100 bis 120° getrocknet. Zu Nr. 4: Die Kost wird UV bestrahlt und soll in 60 Tagen Xer-

---

30) Osborne c. s., J. of biol. Chem. 37, 557 (1919); 15, 311 (1913); 33, 55 (1918); 45, 277 (1921).
31) Funk, Die Vitamine.
32) Potter, Science 1932, 1952.
33) Kuhn c. s., Z. physiol. Chem. 213, 1 (1932).
34) McCollum c. s., J. of biol. Chem. 33, 55 (1918).

Weitere A-freie Kostformen

Nr.	Autor	Casein	Stärke	Dextrin	Hefe	Salz-gemisch	NaCl	Fleisch	Fett	Agar
3	**Sherman, c. s. 35), 35 a), 36), 37)**	**18**	**67**		**10**	**4**	**1**			
4	Sure 38).	20		66	10	4				
5	Cady, c. s. 39)	18		70—72	6—8	4				
6	Nelson, c. s. 40)	18		67	8	4				2
7	Steenbock, c. s. . . .	18		69	6,9	4				
8	Ahmad, c. s.	20	75		5	4				
9	Sherman, c. s. 41) . . .		82		4	4		10		
10	Pittenger 42)		78		6	4		18		
11	Coward, c. s. 43). . . .	15		73	8	4				
12	Drummond, c. s. 44), 45)	20	50		5	5			15	
13	**v. Euler, c. s. 46), 47)** .	**20**	**50**		**10**	**5**			**12**	
14	Drummond, c. s. 48). .	15	70		5	5				
15	Osborne, c. s.	18	51		5	4			22	
16	Heß, c. s. 49)	21	57			5			17	
17	Funk, Scheunert 50) .	20	55		5	5			15	
18	Olcott, c. s. 51)	18		46	8	4			24	
19	Randoin, c. s. 52) . . .	17		63,5	3,5	4			12	
20a	Hauge, c. s. 53)	18		63	3	4			10	2
20b		15	20	52	3	3			5	2
20c		18	25	38	3	4			10	2
21	Morgan, c. s. 54) . . .	19		71		4			5	2
22	Culhane 55)	20	60		5	5			9,9	
23	Bacharach 56)	20	50			5			10	
24	Moore 57)	20	60		7,5	5			15	

35) Sherman c. s., J. of biol. Chem. 88, 683 (1930).
35a) Norris, J. Nutrit. 5, 495 (1932).
36) Russell, J. of biol. Chem. 85, 289 (1929).
37) Sherman c. s., J. amer. chem. Soc. 47, 1639 (1925).
38) Sure, J. of biol. Chem. 83, 375 (1929).
39) Cady c. s., J. of biol. Chem. 86, 743 (1931).
40) Nelson c. s., J. of biol. Chem. 80, 215 (1928).
41) Sherman c. s., J. amer. chem. Soc. 47, 1646 (1925).
42) Pittenger, Amer. J. Pharmacy 100, 63 (1928).
43) Coward c. s., Biochemic. J. 24, 1952 (1930).
44) Drummond c. s., Biochemic. J. 13, 81 (1919); 14, 661 (1920); 19, 1068 (1925); 23, 785 (1929).
45) Zilva c. s., Biochemic. J. 15, 654 (1921).
46) v. Euler c. s., Z. physiol. Chem. 213, 21 (1932).
47) Chick c. s., Biochemic. J. 20, 633 (1926).
48) Drummond c. s., Biochemic. J. 19, 1068 (1925).
49) Heß c. s., J. of biol. Chem. 47, 395 (1921).
50) Scheunert c. s., Milchwirtschaftl. Forschg 3, 117 (1926).
51) Olcott c. s., J. of biol. Chem. 94, 185 (1931—33).
52) Randoin c. s., Bull. Soc. Chim. biol. Paris 15, 706 (1933).
53) Hauge c. s., J. biol. of Chem. 86, 161 (1930); 93, 657 (1931).
54) Morgan c. s., J. of biol. Chem. 88, 9 (1930).
55) Culhane, Biochemic. J. 27, 69 (1933).
56) Bacharach, Biochemic. J. 27, 5 (1933).
57) Moore, Biochemic. J. 23, 803 (1929).

ophthalmie erzeugen. Die Salzmischung ist McCollumsche. Zu Nr. 5: Das Casein wird vor der Zubereitung UV bestrahlt. Zu Nr. 6: Die Salzmischung ist die Osbornesche. Man gibt zur Kost noch 1% Öl hinzu, das vorher UV bestrahlt wurde oder dem bestrahlten Ergosterin zugesetzt wurde. Das Casein wird 10mal heiß mit Alkohol extrahiert, getrocknet, gemahlen und an der Luft erhitzt. Zur Dextrinierung der Stärke autoklaviert man die angefeuchtete Masse 2 Stunden bei 15 Pfund Druck und trocknet im Heißluftstrom bei 50—55°. Nach dem Trocknen wird staubfein zermahlen. Zu Nr. 7: Das Casein wird 2 Wochen in dünner Schicht auf 90° erhitzt. Die Kost enthält insgesamt 7% Hefe, von denen aber 0,1% erst nach UV-Bestrahlung zugegeben werden. Zu Nr. 8: Man gibt zur angeführten Mischung noch 0,01 mg bestrahltes Ergosterin pro Tag/Tier. Die Kost soll in 4—5 Wochen Wachstumsstillstand erzeugen. Zu Nr. 9: Die Kostmischung ist unter der Bezeichnung Nr. 701 bekannt. Das Fleisch muß in Pulverform vorliegen. Es wird wiederholt mit heißem Alkohol extrahiert, um anhaftendes Vitamin A zu entfernen. Die Salzmischung ist die Osbornesche. Für D-Zufuhr muß gesorgt werden. Zu Nr. 10: Vitamin D muß zugegeben werden. Zu Nr. 11: Die Kost ist unter der Bezeichnung A 51 C bekannt. Das Casein ist das light white Casein des British Droug. House. Mit Glaxo Casein (vitaminfrei) wurden schlechte Ergebnisse erzielt. Als Stärke wird Reisstärke dextriniert. Vitamin D-Zugabe nötig. Zu Nr. 12: Die Diät ist diejenige Form, aus der sich fast alle anderen entwickelt haben. Reinigung der Bestandteile unter 1 und 2. Zugabe von Apfelsinensaft zu 5% der Kost. Nach den heutigen Erfahrungen unnötig. Die Diät wurde von Chick-Roscoe (l. c. 47) zunächst ohne Zusatz von Vitamin D gegeben. Erst nach 5 Wochen erhielten die Tiere das Futter UV-bestrahlt und waren in weiteren 1—2 Wochen für den kurativen Test brauchbar. Zu Nr. 13: Verabreichung von Vitamin D in Form von Vigantol. Als Fett dient gehärtetes Arachisöl. Reinigung unter 2. Zu Nr. 14: Zufuhr von Vitamin D nötig. Ursprüngliche Zugabe von 5% Zitronensaft unnötig. Zu Nr. 15: Zugabe von Vitamin D. Reinigung wie unter 1 und 2. Als Fett wird Crisco = gehärtetes Baumwollsamenöl gegeben. Zu Nr. 16: Reisstärke, Osborne-Salzgemisch, hydriertes Baumwollsamenöl. Als B-Zugabe 60 mg Osborne-Wakeman-Hefeextrakt pro die. Zugabe von Vitamin D nötig. Zu Nr. 17: Das Casein wird 4 Stunden in dünner Schicht UV bestrahlt, die Reisstärke desgleichen. Das Arachisöl wird 8 Stunden bei 150° durchlüftet. Das Salzgemisch ist das McCollumsche. Die Tiere erhalten außerdem 1 Tropfen Vigantol pro Woche. Statt Arachisöl kann erhitztes durchlüftetes Palmin verwandt werden. Zu Nr. 18: Die Salzmischung ist die Osbornesche. Statt Dextrin wird reiner Rohrzucker gegeben. Pro Kilogramm enthält die Mischung 10 Tropfen Viosterol. Zu Nr. 19: Die Kost soll besonders für den Prophylaxeversuch geeignet sein. Statt Casein wird Muskelpepton gegeben. Als Fett nimmt man Arachisöl. Das Salzgemisch ist das Osbornesche. Zu Nr. 20a, b, c: Salzgemisch nach McCollum. Fett ist Schweineschmalz. Zufütterung von bestrahltem Ergosterin. Xerophthalmie nach 3—4 Wochen. Die beiden letzten Kostformen sind brauchbar für die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes der verschiedenen Getreidearten, indem man die Stärke (Maisstärke) durch das zu prüfende Mehl ersetzt. Zu Nr. 21: Salzmischung Osborne, Fett = UV bestrahltes Crisco. Dazu 0,5 g Trockenhefe pro Tag/Tier. Zu Nr. 22: Als Hefe wird der Marmiteextrakt benutzt. Xerophthalmie nach 2 bis 6 Wochen. Bekannt unter der Bezeichnung A 5. Reisstärke, Drummondsches Salzgemisch, dazu Radiostol 3000 E. 0,1% der Kost. Ein Vergleich der Kostmischung mit Nr. 11 ergab, daß letztere die Tiere nicht genügend xerophthalmisch machte, da sie etwas Vitamin A enthielt. Das in vorliegender Kost benutzte Casein wurde extrahiert und erhitzt. Zu Nr. 23: Als Casein wird Glaxo Casein (vitaminfrei) benutzt. Die schlechten Erfahrungen Cowards (Nr. 11) konnten nicht bestätigt werden. Reisstärke, McCollum-Salzgemisch, Arachisöl wurden verwandt. Die Mischung soll außerdem noch weitere 5% fettfreie Weizenkeime und 5% Zitronensaft enthalten. Als Vitamin D wird 2mal wöchentlich jedem Tier Vigantol (100 E.) verabreicht. Zu Nr. 24: Das Casein ist Glaxo Casein. Reisstärke, Arachisöl, statt Hefe Marmiteextrakt. Pro Tag/Tier wird 1 Tropfen Radiostol (D) gegeben.

3. Vitamin A-arme Diäten für Kücken

Diät von Elvehjem-Neu, l. c. 5

Gemahlener Mais (weiß) .	58 %
Weizenmehl, mittelfein . .	25 %
Casein	12 %
Salzgemisch	1 %
Calciumcarbonat	1 %
Calciumphosphat	1 %
Trockenhefe	2 %

Zugabe von 2 % Lebertran ermöglicht normales Gedeihen. Die Tiere erhalten zu obiger Kost Wasser ad libitum und werden wöchentlich 3mal je 20 Minuten UV bestrahlt.

4. Vitamin A-arme Diäten für Meerschweinchen

a) Diät von Simola.

Mit der Kostform von Simola gelingt es, Meerschweinchen zum Wachstumsstillstand zu bringen. Die Kost ist nicht ganz A-frei, enthält aber für das Wachstum ungenügende Vitaminmengen.

Hafer, schwarz	800 g
Weizenkleie	800 g
Casein	80 g
$CaCO_3$	80 g
NaCl	20 g

Die Tiere erhalten außerdem dezitrierten Zitronensaft in Mengen von 3—4 ccm pro die. Wachstumsstillstand und Gewichtsverlust treten schon nach 3—4 Wochen auf. Zulage von 0,0075 mg Carotin oder 0,075 mg Xanthophyll ruft dann starkes Wachstum hervor, das aber nach gewisser Zeit wieder aufhört und durch erneute größere Dosen wiederkehrt.

b) Diät von Wolbach, Howe, Tozer, Book usw.

Meerschweinchen werden zunächst mit einer Kost untenstehender Zusammensetzung etwa 4 Wochen lang gefüttert, bis sie ein Gewicht von 550—560 g erreicht haben. Dann ändert man die Mischung durch Ersatz der Butter durch Schweineschmalz und durch Reduktion der Zitronensaftgaben auf täglich 4 ccm. Die Kost ist nicht ganz A-frei. Versuche mit reiner Ascorbinsäure liegen nicht vor.

Casein	15 %
Stärke	75 %
Butterfett	6 %
Salzgemisch Osborne . .	3 %
Hefe	2 %

Filterpapier und Wasser ad libitum, dazu täglich 20 ccm Zitronensaft.

C. Die einzelnen Testmethoden

Zur Auswertung des Vitamin A-Gehaltes sind verschiedene Methoden in Anwendung, von denen hier nur die bewährten genannt seien:

1. Der Heilungstest, d. h. der Test, der die Heilung der Xerophthalmie als Kriterium für die Vitamin A-Wirkung benutzt, wurde namentlich von Coward und Mitarbeitern empfohlen, ist aber nach den heutigen Erfahrungen den anderen Methoden unterlegen.
2. Der Wachstumstest von Drummond und Sherman mit ihren Mitarbeitern ist die gebräuchlichste Methode und kann entweder kurativ oder aber prophylaktisch verwandt werden.

3. Der Kolpokeratose-Test von Hohlweg und Dohrn, der namentlich in der von Laquer und Mitarbeitern ausgearbeiteten Modifikation brauchbar ist.
4. Der Resistenztest von Boynton-Bradford, der, was Empfindlichkeit anbetrifft, den anderen Methoden mindestens gleichwertig ist.

1. Der kurative Wachstumstest

Der kurative Wachstumstest, der auf Grund der Arbeiten von Osborne-Mendel, Steenbock, Drummond, Coward und Sherman ausgearbeitet wurde, beruht auf der Erscheinung, daß Ratten, die alle für das Wachstum nötigen Vitamine enthalten, das Wachstum einstellen, wenn in der Diät das Vitamin A fehlt. Zulage von Vitamin A beeinflußt das Wachstum spezifisch. Der Test zerfällt in eine Vorperiode, während der die Tiere eine der oben angegebenen Kostformen, die A-frei sind, erhalten, bis die A-Reserven des Organismus erschöpft sind, und in eine Versuchsperiode, während der die zu testende Substanz verabreicht wird.

a) Vorperiode: Junge Ratten, die nach den oben angegebenen Richtlinien ausgewählt wurden, erhalten eine A-Mangelkost, bis sie das Wachstum einstellen und Symptome von Xerophthalmie zeigen. Die Tiere werden 2—3 mal wöchentlich gewogen. Wachstumsstillstand und Xerophthalmie treten gewöhnlich nach 3—5 Wochen auf. Wenn die Tiere 7 Tage lang nicht mehr zunehmen oder aber schon abzunehmen beginnen, ist die Vorperiode zu Ende und die zu prüfende Substanz wird zugefüttert. Das ist etwa in der 6. Versuchswoche der Fall.

Die Tiere, die zu Anfang des Versuchs etwa 40—50 g wiegen, haben dann ein Gewicht von etwa 70—130 g erreicht. Für den Testversuch sind aber nur solche mit einem Gewicht von 70—100 g brauchbar. Wenn möglich, sind die Grenzen noch enger zu stecken.

Steenbock und Mitarbeiter legen das Gewicht der Testtiere zu 70—125 g fest. Von 144 Tieren die A-frei ernährt wurden, waren nach der Vorperiode 15 zu schwer und 20 an Infektionen erkrankt. Im allgemeinen ist das Gewicht der Ratten auf einer A-freien Kost nach Beendigung der Vorperiode auf der Steenbock-Diät 56 g, auf der Sherman-Kost 71 g und auf der reishaltigen Steenbock-Kost 65 g.

Im allgemeinen wird man das Gewicht der weiblichen Tiere zu Beginn der Versuchsperiode mit 75—95 g und das der männlichen mit 75—100 g begrenzen. Coward 58) nimmt für weibliche 84 g und für männliche Ratten 87 g.

Die Augenerscheinungen treten bei 50 % der Tiere schon vor der Gewichtsabnahme auf, bei 40 % während der Gewichtsabnahme und bei 10 % fehlen sie ganz. Negative Kontrollen gehen, wenn man sie unbehandelt läßt, unter weiterem starkem Gewichtssturz 50—60 Tage nach Beginn der Mangelkostdarreichung gerechnet, zugrunde.

b) Versuchsperiode: Die Versuchsperiode schließt sich unmittelbar an die Vorperiode an. Der Beginn der Versuchsperiode fällt auf den 7. Tag nach dem Gewichtsstillstand. Bei starkem Gewichtsabfall kann auch schon früher mit der Darreichung der zu prüfenden Substanz begonnen werden. Tiere, die schon ausgeprägte Xerophthalmie zeigen, scheiden für den Versuch aus. Selten hört die Gewichtsabnahme aller Tiere einer Serie auf einmal auf. Man nimmt dann

58) Coward, Biochemic. J. 26, 691 (1932).

die Tiere, die 7 Tage lang nicht zugenommen haben. Die anderen folgen erst einige Tage später nach.

Jeder Test wird mit mindestens 10 Tieren für jede zu prüfende Dosis ausgeführt, z. B. für 5 Dosen desselben Präparats 6 Serien von je 10 Tieren. Dabei achtet man auf die oben gegebenen Anweisungen über die Verteilung der Tiere nach Abstammung, Gewicht, Geschlecht usw. Von diesen Serien dient eine als negative Kontrolle, die anderen bekommen steigende Mengen des Präparats. Um die Wirkung des unbekannten Präparats gleich auf die internationale Einheit zu beziehen, empfiehlt es sich, eine der obigen Serien mit einer bekannten Dosis eines Standardpräparates zu behandeln, um auf diese Weise die Wirkung des Standards zur Wirkung des Unbekannten in Beziehung zu bringen.

Die Höhe der Dosis ist derart zu wählen, daß die Gewichtszunahme der Tiere pro Woche etwa 3 g beträgt. Auf diese Weise ergibt sich am leichtesten eine klare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung.

Die verschiedenen Dosen sind stets in derselben Menge Öl mit der Sonde oder Pipette zu verabreichen. Man verwendet am besten als Einheitsdosis 0,1 ccm Sesamöl, das 4 Stunden bei 200° im Hochvakuum erhitzt wurde. Für gründliche Durchmischung der öligen Lösung muß gesorgt werden. Olivenöl kann Peroxyde enthalten, die das Vitamin schnell zerstören. Zusatz von Hydrochinon 0,002 bis 0,05 % hat einen schützenden Effekt. Äthyloleat ist als Lösungsmittel unbrauchbar **59)**. Die Zufütterung hat täglich getrennt von der Nahrung zu erfolgen, da feinverteilte Stoffe, wie Stärke, das Vitamin zerstören können. Bei der Darreichung ist zu beachten, daß große Dosen einmalig verabreicht dieselbe Wirkung haben, wie kleine Portionen derselben Dosis über längere Zeit verteilt **60)**.

Ist die zu prüfende Substanz kein Öl und relativ A-arm, so kann man entweder das Vitamin vorher aus diesen Stoffen extrahieren oder man ist gezwungen, einen erheblichen Teil der Kost durch die zu prüfende Substanz zu ersetzen. Man hat diese Methode mit Erfolg auf die A-Bestimmung im Mais angewandt. Dabei wurde in der Kost stets ein bestimmter Teil der Stärke durch das Maismehl ersetzt.

c) Dauer der Versuchsperiode: Der Testversuch dauert 5—6—8 Wochen. Im allgemeinen ist eine Versuchsdauer von 35 Tagen anzuraten.

In Amerika benutzt man vielfach eine achtwöchentliche Periode. Eine solche ist nicht zu empfehlen, da die Tiere zwar in den ersten 5 Wochen regelmäßig an Gewicht zunehmen, nach dieser Zeit aber Unregelmäßigkeiten auftreten, bei denen die tägliche Gewichtszunahme für eine Woche berechnet für die 5.—8. Woche immer kleiner wird. Die tägliche Gewichtszunahme für den gesamten Achtwochenversuch wird hierdurch kleiner als für den Fünfwochenversuch. Daher ist eine Einheit im Fünfwochenversuch ausgewertet eine kleinere Größe als im Achtwochenversuch. Mit anderen Worten wird für eine gegebene Vitaminmenge im Fünfwochenversuch mehr herauskommen als im Achtwochenversuch. Die Begrenzung der Versuchsperiode auf 5 Wochen erhöht die Werte um etwa $^1/_6$.

Nach Sherman-Burtis **61)** kam für eine gegebene Vitaminmenge im Fünfwochenversuch eine durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahme von 3,62 g, im Achtwochenversuch eine solche von 3,24 g heraus. Bei längerem Versuch treten unregelmäßige Schwankungen der Gewichtskurve auf.

---

59) Huston c. s., J. of biol. Chem. 79, 507 (1928).
60) Olcovitt-Matill, J. of biol. Chem. 91, 105 (1931).
61) Sherman c. s., Dissertation, New York 1928 (s. Hume-Smith, Biochemic. J. 22, 504).

Schmidt-Nielsen 62) und Mitarbeiter sehen die Ursache dieser Schwankungen der Gewichtskurve in der während des Versuchs einsetzenden Pubertät des Tieres. Sie fanden, daß die fallende Gewichtskurve nach weiteren Wochen wieder anstieg. Daher empfehlen sie eine Dauer der Versuchsperiode von mindestens 3 Monaten oder besser eine solche von 5 Monaten.

Coward und Key 63) geben verschiedene Reaktionstypen verschiedener Tiere auf dieselbe Dosis Vitamin A, die aus folgender Abbildung ersichtlich sind. Um diese auszuschalten, muß man eine Versuchsperiode von mindestens 8 Wochen nehmen. Nach Coward 64) ist eine Auswertung zwar um so genauer, je länger sie ausgedehnt wird, aber sowohl Zeitaufwand wie auch Arbeitsleistung stehen in keinem Verhältnis zur Verbesserung der Genauigkeit. Daher genügt ein Dreiwochenversuch stets.

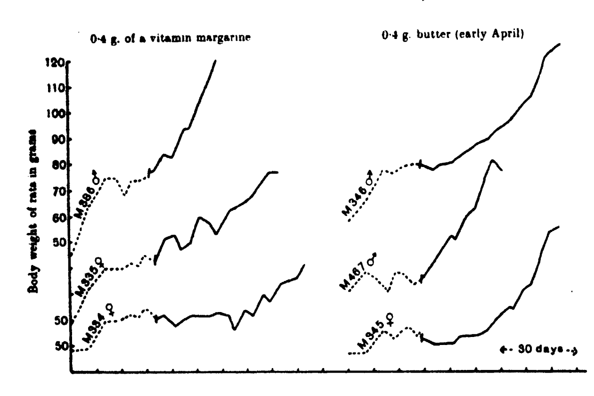


Abb. 18. Reaktionstypen A-frei ernährter Ratten auf Zugabe derselben Vitamindosis.
Gestrichelte Kurven = Gewichtsverlauf während der Vorperiode, ausgezogene Kurven = Gewichtsverlauf während der Behandlungsdauer. (Nach Coward.)

d) Festlegung der Einheit: Nach Hume-Smith 65) ist die Reaktion auf kleine Dosen gleich Null. Mittlere Dosen des Vitamins erzeugen subnormalen Gewichtsanstieg mit später fallender Kurve. Größere Gaben führen vorübergehend zu normalem Wachstum. Erst optimale Dosen ermöglichen dauernde Gewichtszunahme.

Verschiedene Autoren bevorzugen die Begrenzung der Gewichtszunahme auf 3 g pro Woche und nennen die Vitaminmenge, die imstande ist, diese Wirkung hervorzurufen, eine Einheit 66).

Die Festlegung der Einheit auf normales Wachstum der Tiere ist weniger sicher und nicht immer reproduzierbar, da verschiedene Rattenrassen verschieden stark wachsen. Auch die von Javillier 67), Dutcher 68) und Euler 69) als Einheit vorgeschlagene „halbe Wachstumswirkung", die einer Zunahme von etwa 6 g pro Woche entspricht, ist abzulehnen.

Sherman definiert die Einheit des Vitamins A als diejenige Menge, die täglich verfüttert nach 5—8 Wochen die Augenerscheinungen zum Abheilen

62) Schmidt-Nielsen, Biochemic. J. 23, 1153 (1929), Kong Norsk Vid. Selsk. 2, 44, 51 (1929).
63) Coward-Key, Biochemic. J. 22, 1019 (1928).
64) Coward, Biochemic. J. 1932 u. 1933.
65) Hume c. s., Biochemic. J. 22, 504 (1928).
66) Zilva c. s., Biochemic. J. 15, 654 (1921).
67) Javillier, C. r. Acad. Sci. Paris 179, 998 (1924).
68) Dutcher c. s., J. of biol. Chem. 75, 85 (1927).
69) v. Euler c. s., Sv. Vet. Ark. Akad. Kemi 9, 117 (1929).

bringt und eine durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahme von 3 g pro Ratte verursacht (U-S-P-Einheit). Besser ist die Definition von Laquer, die auch dem Vogan zugrunde liegt, und nach der eine Einheit diejenige Menge darstellt, die täglich verabreicht, nach 35 Tagen einen Gewichtsanstieg von i. D. 15 g und bei 60 % der Tiere herbeiführt und die Augenerscheinungen zum Abheilen bringt.

e) **Auswertung der Versuchsergebnisse:** Bei Auswertung der Versuchsergebnisse muß ein deutlicher Gang zu erkennen sein, derart, daß Tiere, die größere Dosen erhielten, auch größere Gewichtszunahme zeigen.

Nach Coward vergleicht man am besten die Gewichtskurven der weiblichen und männlichen Tiere getrennt. Bei Begrenzung der Gewichtszunahmen auf etwa 3 g pro Woche ist das aber unnötig. Bei der Auswertung der Kurven bleiben die Tiere, die in den ersten 20 Tagen des Versuchs eingehen, unberücksichtigt. Auch Tiere, die aus der Reihe herausfallen und einen ungleichmäßigen Kurvenverlauf haben, werden nicht gewertet.

Aus der Tabelle von Laquer und Mitarbeiter ist ein Auswertungsbeispiel in allen Phasen ersichtlich: Tabelle 10 zeigt die Zusammenfassung der Werte. Danach sterben bei der Tagesdosis von 2 mg von 10 Tieren 3. Von den restlichen erreicht der Durchschnitt eine Gewichtszunahme von 15 g, jedoch nur bei 3 Tieren, d. h. 43 %. Bei der Tagesdosis von 2,5 mg ist die Gewichtszunahme 21 g. Eine Gewichtszunahme von 15 g erreichen 9 von 10 Tieren, also 90 %. Bei der Tagesdosis von 1 mg und 0,5 mg geht ein großer Teil der Tiere ein, die überlebenden zeigen Augenveränderungen und erreichen nicht die geforderte Gewichtszunahme. Die wirksame Dosis liegt zwischen 2 und 2,5 mg, also innerhalb einer Differenz von 25 %.

In Einheiten ausgedrückt hat der geprüfte Lebertran also etwa 400 bis 500 Einheiten pro Gramm. Bei Carotin liegt die wirksame Dosis zwischen 2 und 3 γ. Vogan erfüllt die Bedingungen des Tests in einer Tagesdosis von 0,025 mg. Es hat danach eine Wirksamkeit von 40000 Ratteneinheiten pro Kubikzentimeter.

Erwähnt sei noch, daß Lebertran-Wasser-Emulsionen oft höhere Werte ergeben als der entsprechende Tran in derselben Dosis, wohl infolge höherer Resorption der Emulsion 70)).

Tabelle 10. (Nach Laquer und Mitarbeiter)

Dosis in mg	Zahl der gewerteten Tiere	Differenz zwischen Anfangs- u. Endgewicht d. Versuchsperiode			Zahl der Tiere					
		kleinste Gewichtszunahme in g	größte Gewichtszunahme in g	Durchschnitt in g	mit mehr als 3 g Gewichtszunahme		mit Xerophthamie		tot nach dem 20. Tage	
					absol.	in %	absol.	in %	absol.	in %
2,5	10	+ 10	+ 32	**+ 21**	9	**90**	0	0	0	0
2,0	7	— 2	+ 37	**+ 15**	3	**43**	0	0	0	0
1,0	11	—	+ 25	**+ 6**	2	**18**	1	9	6	55
0,5	7	—	—	**0**	0	**0**	4	60	5	70

70) Jones c. s., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 511 (1933).

Tabelle 11. (Nach Laquer und Mitarbeiter)

Datum (Beginn der Versuchsperiode 1932)	Ratte Nr.	Geschlecht	Tagesdosis in mg	Gewicht und Alter bei Beginn der Mangelperiode: Gewicht in g	Gewicht und Alter bei Beginn der Mangelperiode: Alter in Tagen	Gewicht und Alter bei Beginn d. Versuchsperiode: Gewicht in g	Gewicht und Alter bei Beginn d. Versuchsperiode: Alter in Tagen	Gewichtsdifferenz gegenüber dem Gewicht bei Beginn der Versuchsperiode in g nach Tagen: 10	20	28	35	Bemerkungen
25. VIII.	2108	weiblich	2,5	42	31	96	68	+ 5	+ 6	+ 9	+16	—
	2119	,,	2,5	39	31	97	68	+ 2	+ 6	+13	+19	—
	2127	männlich	2,5	38	27	96	66	+15	+22	+32	+32	—
	2133	weiblich	2,5	38	34	90	69	+11	+14	+16	+18	—
	2135	männlich	2,5	40	34	94	66	+ 3	+15	+24	+27	—
	2136	weiblich	2,5	38	34	98	66	+11	+19	+27	+27	—
	2138	männlich	2,5	39	34	91	66	+ 6	+11	+20	+21	—
	2173	weiblich	2,5	39	35	99	76	+ 4	+10	+16	+18	—
	2182	,,	2,5	38	35	98	76	+10	+19	+23	+20	—
	2192	,,	2,5	42	32	98	76	— 8	0	+ 9	+10	—
		Im Durchschnitt:		39	33	96	70	+ 6	+12	+19	+21	
25. VIII.	1997	männlich	2,0	40	35	84	65	+ 5	+13	+13	+18	—
	1998	,,	2,0	41	35	78	67	+ 2	—	—	—	Eingegangen am 14. Tag.
	1999	weiblich	2,0	44	35	71	65	+ 4	+ 5	+ 4	— 2	—
	2001	männlich	2,0	43	35	81	65	0	+ 6	+14	+11	—
	2006	weiblich	2,0	39	35	81	65	+ 5	+12	+17	+ 1	—
	2008	,,	2,0	43	32	91	62	+21	+28	+34	+30	—
	2012	,,	2,0	45	32	89	62	+ 7	+ 3	+12	+11	—
	2014	,,	2,0	44	35	91	65	+ 8	+21	+37	+37	—
	2031	,,	2,0	44	36	72	64	—	—	—	—	Eingegangen am 4. Tag.
	2058	männlich	2,0	43	34	97	68	—	—	—	—	Eingegangen am 6. Tag, Magengeschwüre, Darmentzündung.
		Im Durchschnitt		43	34	83	65	+ 7	+12	+19	+15	
25. VIII.	2019	weiblich	1,0	43	35	72	65	+30	+20	+31	+25	—
	2021	,,	1,0	43	32	85	62	+23	+27	—	—	Eingegangen am 31. Tag, Abszesse am Zungengrund.
	2025	männlich	1,0	39	32	92	62	— 2	+ 1	+ 4	+ 6	—
	2033	,,	1,0	43	34	72	67	+ 9	+12	+17	—	Eingegangen am 30. Tag.
	2047	,,	1,0	41	35	76	68	+14	+15	+16	+16	—
	2051	,,	1,0	40	39	89	72	+21	+23	+14	—	Eingegangen am 31. Tag, Blutung im Magen.
	2055	,,	1,0	45	27	84	59	+ 1	+ 3	—	—	Eingegangen am 27. Tag, Blutung im Magen, Darmentzündung.
	2064	,,	1,0	40	35	81	66	+14	+13	+11	+10	—
	2071	,,	1,0	42	39	81	71	+12	+15	+14	+ 9	Xerophthalmie ab 32. Tag.
	2074	weiblich	1,0	44	39	72	71	+11	+19	+13	—	Eingegangen am 31. Tag, Abszesse am Zungengrund, Blutung in der Blasenwand, Blasensteine.
	2079	,,	1,0	42	39	84	71	+ 4	+ 4	—	—	Eingegangen am 25. Tag, Abszesse d. sublingualen Speicheldrüse.
		Im Durchschnitt:		42	35	80	66	+12	+13	+11	+ 6	
27. VIII.	1976	männlich	0,5	40	31	96	70	+ 2	+18	—	—	Xerophthalmie ab 20. Tag, eingegangen am 21. Tag, Abszesse am Zungengrund, Magengeschwüre, Darmentzündung.
	1989	weiblich	0,5	38	36	84	75	+ 3	—	—	—	Eingegangen am 18. Tag.
	2016	männlich	0,5	43	35	85	67	+15	+18	0	—	Xerophthalmie ab 27. Tag, eingegangen am 33. Tag, Abszesse und Geschwülste im Zungenrund, Blutung im Magen.
	2018	weiblich	0,5	39	35	92	67	+15	+20	—	—	Eingegangen am 26. Tag, Magengeschwür, Blutung in der Blasenschleimhaut, Blasensteine.
	2020	männlich	0,5	44	35	96	67	+10	+15	— 3	—19	Xerophthalmie ab 32. Tag.
	2073	,,	0,5	44	39	100	73	— 1	—	—	—	Eingegangen am 15. Tag, Geschwüre u. Abszesse im Zungengrund.
	2021	,,	0,5	41	36	72	66	— 3	— 5	—	—	Xerophthalmie ab 13. Tag, eingegangen am 28. Tag, Abszesse in den Halslymphdrüsen.
	2166	,,	0,5	42	33	90	63	0	—16	— 7	—13	Xerophthalmie ab 32. Tag.
	2171	,,	0,5	41	35	89	67	—	—	—	—	Eingegangen am 8. Tag.
	2172	,,	0,5	42	35	73	65	+ 2	+ 5	+11	—	Eingegangen am 32. Tag.
		Im Durchschnitt:		41	35	89	68	+ 4	+ 3	—	—	

Übersichtliche Bilder über den Versuchsverlauf erhält man durch Eintragung der Werte in ein Koordinatensystem (siehe Abb. 19 und 20).

Man kann natürlich die gefundenen Ergebnisse auch in anderer Weise auswerten. So ist es zulässig, beim Vergleich zweier Substanzen anzugeben, wieviel Gramm jeder Substanz dieselbe Gewichtszunahme verursacht. Eine weitere Möglichkeit ist die Zurückführung der untersuchten Substanz auf ein Standardpräparat. Ein solcher Vergleich ist immer am sichersten und man ist ziemlich unabhängig von der benutzten Kostform, von der Auswertungsdauer usw. Voraussetzung ist dabei natürlich, daß bei jedem Test das Standardpräparat mit ausgewertet wird. Über internationalen Standard s. S. 63. Auch die Aufstellung einer Standardkurve, die natürlich mit großem Tiermaterial erfolgen soll, kann zur Auswertung herangezogen werden. Man bestimmt dann für verschiedene Dosen des Standards die Gewichtszunahmen und trägt sie auf der Ordinate eines Koordinatensystems ein.

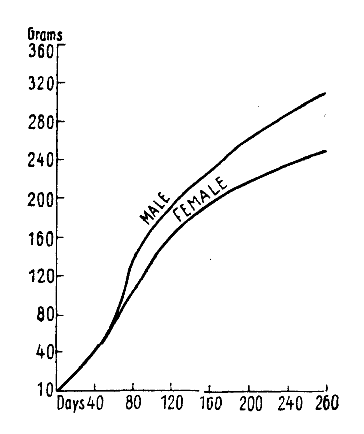


Abb. 19. Gewichtskurven männlicher (Male) und weiblicher (Female) Ratten auf vollwertiger Kost. (Nach Pittenger.)

Abb. 20. Gewichtskurve einer Ratte während des kurativen Wachstumstests. Vorperiode bis zum Kreuz, Behandlungsperiode. (Nach Pittenger.)

Die Dosis steht an der Abszisse. Aus der erhaltenen Kurve kann man die der ermittelten Gewichtszunahme entsprechende Menge des Standards ablesen und somit das unbekannte Präparat gleich in Standardeinheiten ausdrücken.

f) Fehlergrenzen der Methode. Nach Coward-Key-Dyer-Morgan (l. c. 63 u. 64) beträgt die Fehlergrenze der Methode bei 10 Ratten pro Dosis etwa 30 %. Sherman fand eine Fehlergrenze von 25 % bei 9 Tieren pro Dosis und einer achtwöchentlichen Versuchsdauer. Coward berechnet bei verschiedener Versuchsdauer die Abweichungen nach oben oder unten vom wahren Wert für den 1—2—3—4- und 5-Wochenversuch nach oben zu 44—28—21—19—17 % und nach unten zu 31—23—18—16—15 %. Zur Erzielung derselben Fehlergrenze muß man doppelt soviel weibliche als männliche Ratten in den Versuch nehmen (z. B. 11 männliche oder 21 weibliche Tiere pro Dosis). Das Geschlecht ist fast ohne Einfluß, wenn die Einheit bei 3 g pro Woche festgelegt wird.

2. Modifikationen der kurativen Methode

a) Methode von Coward. Nach Coward ist die Lebensdauer der Tiere im kurativen Testversuch proportional der gegebenen Vitaminmenge. Läßt man die Tiere, die in der ersten Woche der kurativen Periode eingehen, unberücksicht und bewertet nur diejenigen von der 2.—5. Woche, so erhält man ein Bild, das mit der Gewichtszunahme übereinstimmt. Ein Beispiel ist in folgender Tabelle gebracht.

Tabelle 12. (Nach Coward.) To show the growth response of groups of rats to different doses of cod-liver oil, extracted "ligth white casein" (B.D.H.) in the diet

Dose of C.L.O. mg	Total no. of rats	Date test began	No. dead in 1 week	No. dead in 2-5 weeks	Rats alive at end of 5 weeks	% increasing 10 g in 5 weeks	Mean increase in 5 weeks g
0,25	31	Jan. 1930	2	15	14 (7 ♂, 7 ♀)	3	—11,5
1,0	37	Apr. 1930	7	6	24 (17 ♂, 7 ♀)	53	13
1,5	35	May 1930	5	3	27 (10 ♂, 17 ♀)	67	17,1
2,5	32	Nov. 1929	1	1	30 (19 ♂, 11 ♀)	90,3	27,7
7,5	31	Dec. 1929	0	1	30 (18 ♂, 12 ♀)	97	48,2 {♂ 55,7 ♀ 37,0}
20,0	32	Dec. 1929	1	0	31 (15 ♂, 16 ♀)	100	45,4 {♂ 53,0 ♀ 37,2}

Tabelle 13. (Nach Collison und Mitarbeiter.) Test of carotene for vitamin A activity

Material tested	Dose mg	No. of litter	No. of rat	Sex	No of days maintenance	Growth during period of experiment g	Notes
Cabbage carotene:							
I.V. 330	0,01	1228	572	♀	28 +	40	—
M.P. 174—178°	,,	1227	577	♂	28 +	76	—
	0,005	,,	579	♀	28	7	Moribund at end of experiment with septic bladder condition
	,,	,,	578	♂	28 +	60	—
	0,003	1223	563	♂	28 +	25	—
	,,	1225	601	♂	28 +	10	Following smaller dose, septic glands in neck
	0,002	1223	564	♂	28 +	16	—
	,,	1275	601	♂	6	— 5	Following smaller dose, changed to larger dose
	0,001	1223	561	♀	24	{6 / —15}	Maintained to end of period on 0,002 mg
	,,	1228	574	♂	4	— 2	Cured by cod-liver oil
	,,	1275	604	♀	3	— 5	Died—septic uterus
	,,	,,	605	♀	14	5	Haematuria
						— 4	
	,,	,,	601	♂	6	— 5	Changed to larger dose
Carrot carotene:							
(a) I.V. 220	0,04	1272	596	♀	28 +	29	—
M.P. 169°	0,02	1223	567	♂	28 +	7	Following dose mother-liquor
	,,	1272	600	♀	28 +	23	—
	,,	,,	597	♂	28 +	29	—

Material tested	Dose mg	No. of litter	No. of rat	Sex	No of days maintenance	Growth during period of experiment g	Notes
(b) Recryst. I.V. 300	0,01	1223	560	♀	28 +	31	Following dose mother-liquor
	,,	1228	573	♂	7	— 6	Fulminating corneal sepsis. Treadet perhaps prematurely with other material—cured
	,,	1227	576	♂	28 +	36	—
	0,005	1275	607	♀	10	— 4	Cured by cod-liver oil
	,,	,,	602	♂	16	—	Changed to 0,01 mg with temporary improvement
	0,004	,,	608	♀	13	— 8	Cured by cod-liver oil
	0,002	1275	603	♂	12	— 8	Cured by cod-liver oil
	0,001	1228	575	♂	5	— 4	Cured by other material
	,,	1275	608	♀	13	— 8	Changed to 0,004 mg
	,,	,,	607	♀	12	—10	Changed to 0,005 mg
	,,	,,	602	♂	7	— 8	Changed to 0,005 mg
Spinach carotene: (a) I.V. 338 M.P. 164⁰	0,012	1300	611	♂	8	—	Haematuria, died, severe stone
	,,	,,	616	♂	28 +	36	Foetid urine
	0,008	,,	609	♀	28 +	15	Haematuria before beginning dosage
	,,	,,	610	♀	18	{ 4 / —13 }	Haematuria—died
(b) I.V. 352	0,010	,,	613	♂	28 +	51	Foetid urine—enlarged gland in neck
	,,	,,	614	♂	8	—10	Haematuria before beginning dosage—died
	,,	,,	615	♂	25	{ 25 / —14 }	Haematuria—recovered with cod-liver oil
(c) After shaking solution with, and filtering through, chalk	0,006	1300	612	♂	28 +	27	—

b) Methode von Collison-Hume-Smedley-McLean 71). Ebenso wie Coward ziehen die genannten Autoren als Kriterium der Wirkung des Vitamins A neben der Gewichtszunahme die Überlebensdauer heran. Junge Ratten erhalten 5—6 Wochen lang eine A-freie fetthaltige Kost mit 6—12% Hefe. Mit der 5. bis 6. Woche tritt Wachstumsstillstand ein, entsprechend gibt man 28 Tage lang die zu untersuchende Substanz.

Als Kriterium der Wirksamkeit gilt die Erhaltung von Leben und Gewicht. Es wird diejenige kleinste Menge A-Vitamin bestimmt, die das Leben 28 Tage erhalten kann. Die Gewichtszunahme in dieser Zeit wird erst in zweiter Linie berücksichtigt. Dann wird diejenige Dosis ermittelt, die diese Bedingungen nicht erfüllt. Die Methode hat den Nachteil, daß viele Tiere eingehen, und zwar auch bei Dosen, die bei anderen wirksam sind, da die Wirkung des verabreichten Vitamins erst nach einer gewissen Latenzzeit eintritt, während der die Tiere noch weiter geschwächt werden.

Die ermittelte Dosis, die für „maintenance" ausreicht, ist natürlich viel kleiner als diejenige, die die im obigen Test geforderte Gewichtszunahme verursacht. Ein Auswertungsbeispiel ist in Tabelle 13 zu sehen.

71) Collison c. s., Biochemic. J. 23, 634 (1929).

3. Der prophylaktische Test

Der prophylaktische Wachstumstest gibt ebenfalls gute Werte. Man verfährt wie oben beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß man von vornherein den Tieren auf der A-freien Diät auch das zu prüfende Präparat verabreicht. Hierbei muß ganz besonders Wert auf gleichartiges Tiermaterial gelegt werden. Die negativen Kontrollen müssen sorgfältig beobachtet werden. In derselben Weise wie oben teilt man die Tiere ein und gibt einer Serie eine bestimmte Menge eines bekannten Standardpräparates, um so die Wirkungen vergleichen zu können. Am besten dehnt man die Versuche auf eine lange Zeit aus (Hume-Smith 73)).

Als Einheit nimmt man entweder die Menge, die gerade den Gewichtsabfall verhindert und das Tier normal erscheinen läßt, oder besser eine der verabreichten Standarddosis entsprechende Menge.

Wir haben mit diesem Test ebenfalls gute Erfolge gesehen, im allgemeinen ist aber der kurative vorzuziehen. Nach Culhane ist der prophylaktische Test mindestens dem kurativen gleichwertig (vgl. auch Scheunert-Schieblich 74), 75), 76).

4. Die Xerophthalmieheilung als Test

Von vielen Autoren wird als Test auf das Vitamin A die xerophthalmieheilende Wirkung benutzt. Die Schwierigkeit hierbei liegt zweifellos in der Beschaffung eines gleichwertigen Tiermaterials, da nicht jedes erkrankte Tier gleichmäßig stark erkrankt ist. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß längst nicht alle Tiere Xerophthalmie entwickeln. Scheunert und Schieblich (l. c. 74) brauchen 10 Tiere pro Dosis und fordern, daß innerhalb 35 Tagen 8 von 10 Tieren am Leben bleiben und Abheilung der Xerophthalmie zeigen sollen.

Die Xerophthalmie heilenden Dosen liegen meist höher als die wachstumssteigernden. Bei einer Zufuhr von 5 γ Carotin pro Woche bleibt die Xerophthalmie unbeeinflußt. Erst Dosen von 20 γ pro Tier und Woche heilen sie.

5. Die Auswertung des Vitamins A nach dem Kolpokeratose-Test

Der Kolpokeratosetest von Hohlweg und Dohrn beruht auf der Erscheinung, daß bei A-freier Ernährung schon vor dem Wachstumsstillstand eine Kolpokeratose 77), 78), 79) genannte Erkrankung der Vaginalschleimhaut der kleinen Nager einsezt, die durch Zufuhr von Vitamin A zum Verschwinden gebracht werden kann. Die zyklischen Veränderungen in der Vaginalschleimhaut der kleinen Nager seien nur kurz skizziert: Im Ruhestadium zwischen den Sexualzyklen finden sich im Ausstrich der Vagina Leukozyten und wenig Epithelien. Im Proöstrus nehmen die Epithelzellen auf Kosten der Leukozyten

73) Hume-Smith, Biochemic. J. 22, 504 (1928).
74) Scheunert c. s., Biochem. Z. 263, 444, 454 (1933).
75) Sherman c. s., J. of biol. Chem. 91, 505 (1931).
76) Coward c. s., Biochemic. J. 22, 1019 (1928).
77) Wolff-Overhoff, Nederl. Tijdschr. Geneesk. 1, 1662 (1933).
78) Wolbach-Howe, J. of exper. Med. 42, 753 (1925); Arch. of Path. 5, 239 (1928).
79) van Eeckelen, Arch. neerl. Physiol. 16, 281 (1931); Z. Vitaminforschg 1, 65 (1932).

zu. Im Vollöstrus tritt eine Verhornung der oberen Epithelschichten ein, die zum typischen Schollenstadium führt. Im Metöstrus, dem Übergang zu einem neuen Intervall, treten wieder Epithelien und Leukozyten auf. Infantile oder kastrierte Tiere zeigen dauernd das Bild des Intervalls: Leukozyten und wenig Epithelien. Ernährt man sie aber mit einer A-freien Kost, so findet man nach kurzer Zeit im Ausstrich Bilder, die einen Vollöstrus vortäuschen, nämlich reines Schollenstadium (Kolpokeratose). Bei Behandlung mit A-wirksamen Substanzen verschwinden schon nach wenigen Tagen die Schollen aus dem Ausstrich. Der Kolpokeratose-Test kann deshalb als umgekehrter Allen-Doisy-Test angesehen werden.

a) Die Technik von Hohlweg und Dohrn 80). Der Test wird an kastrierten Ratten ausgeführt. Die Tiere werden A-frei ernährt. 15 Tage nach Beginn der Fütterung werden täglich Scheidenabstriche gemacht und untersucht. Die Bilder lassen sich in vier Stadien teilen:

Stadium 0 = Stadium der normalen kastrierten Ratte,
,, 1 = Beginn des Auftretens der Schollen,
,, 2 = im Ausstrich 50 % Schollen,
,, 4 = im Ausstrich 100 % Schollen.

Nachdem die Tiere etwa 1 Woche lang Bilder der Stadien 2 und 3 gezeigt haben, sind sie für die Auswertung einer A-haltigen Substanz brauchbar. Je 3—5 Tiere erhalten die zu prüfende Substanz in Arachisöl gelöst mit der Schlundsonde in vier Portionen auf 2 Tage verteilt. War die Dosis wirksam, so zeigt sich gewöhnlich schon am dritten Tag im Ausstrich das Stadium 0. Der Test ist ebenso empfindlich wie der kurative Wachstumstest. 5 γ Carotin oder 1 Blaueinheit pro Tag und Tier heilen innerhalb 4—5 Tagen.

b) Die Technik von Laquer und Mitarbeitern (l. c. 7 b). Kastrierte oder nicht kastrierte Rattenweibchen werden A-frei ernährt, wobei man fortlaufend den Vaginalabstrich kontrolliert. Mit Beginn der Versuchsperiode erscheinen vermehrte Leukozyten und kernhaltige Zellen. Einige Tage später sieht man verhornte Zellen, die nach weiteren 2—3 Tagen das ganze Bild beherrschen. Das Schollenstadium bleibt bis zum Tode des Tieres bestehen. Prophylaktische Darreichung von Vitamin A oder Carotin in Dosen, die zum normalen Wachstum genügen, verhütet die Entstehung der Kolpokeratose. Ungenügende Dosen verzögern ihre Entstehung. Als Test bietet aber die Prophylaxe vor der Wachstumsmethode keine Vorteile. Besser ist der therapeutische Test.

Man benutzt Rattenweibchen, die 100 % Schollen im Abstrich zeigen. Erhalten die Tiere eine einmalige Dosis Vitamin A oder Carotin, so ist zunächst am darauffolgenden Tage das Abstrichbild unverändert. Am zweiten Tage treten die Schollen zurück und erst am dritten Tage sind sie vollkommen verschwunden. Bei hohen Dosen können auch die Leukozyten zurückgehen, so daß der Ausstrich zur Hauptsache aus Schleim besteht. Das schollenfreie Stadium kann, je nach der Dosis, bis zu 1 Woche anhalten. Sobald das gespeicherte Vitamin aufgebraucht ist, erscheinen im Ausstrich wieder Schollen. Die Tiere reagieren dann auf eine erneute A-Gabe wie zuvor.

---

80) Hohlweg-Dohrn, Z. exper. Med. 71, 762 (1930); Proc. 2nd internat. Congr. Sex. Res. London 1930.

Die Zeit, in der die Schollen aus dem Abstrich verschwunden sind, ist der verabreichten Vitaminmenge proportional. Schwankungen kommen, wie bei jedem biologischen Test, vor. Gewöhnlich reagieren Tiere, die erstmalig behandelt werden, außerhalb der Reihe. Sie zeigen entweder abnorm lange im Ausstrich das schollenfreie Stadium oder das Schollenstadium bleibt trotz der Behandlung bestehen. Auch Ratten, die lange Zeit unbehandelt gelassen wurden, reagieren oft überhaupt nicht. Die Reaktion ist nur dann gleichmäßig, wenn nach dem Wiederauftreten des Schollenstadiums die Zeit bis zur erneuten Behandlung abgegrenzt wird. Gleichmäßiger wird der Test weiter bei Benutzung kastrierter Tiere, da sich sonst östrale Erscheinungen doch öfter bemerkbar machen. Die Auswertung erfolgt an Hand von Kurven. Beispiel s. Abb. 21.

Aus der Abbildung geht hervor, daß ein Abstand der Ordinate von 2 cm das schollenfreie und das Schollenstadium abgrenzen. Auf der Abszisse ist 1 cm = 1 Tag.

In dieses Schema trägt man die täglichen Befunde ein. Es entsteht so eine Reaktionskurve. Sie bildet mit einer weiteren Linie, die den Anfangs- und Endpunkt der Reaktion verbindet und als 100%ige Schollenlinie parallel der Abszisse verläuft, eine Fläche, die in Quadratmillimeter ausgemessen einen Maßstab der Wirkung abgibt. Man bezeichnet die Wirkung in Wirkungszahlen = ausgemessenen Quadratmillimetern. Aus Tabelle 14 geht ein Auswertungsbeispiel hervor.

Abb. 21. Auswertung des Vitamins A nach dem Kolpokeratosetest. (Nach Laquer.)

Wichtig ist die Zeitdauer zwischen dem Ende der einen Reaktion und dem Beginn der erneuten Behandlung. Sie muß 4—5 Tage betragen. Während dieser Zeit soll der Abstrich 100% Schollen zeigen.

Für die Auswertung der Ergebnisse legt man am besten die Dosis fest, die eine durchschnittliche Wirkungszahl von 800—1000 gibt, weil hierbei das schollenfreie Stadium immer erreicht wird und der Versuch nur 4—5 Tage dauert, so, daß die Tiere nach der vorgeschriebenen Zeit wieder versuchsreif sind. Höhere Dosen benötigen eine längere Versuchsdauer und niedrigere werden in den Ausschlägen zu ungenau (Tabelle 14).

Die Färbung des Ausstrichs, der mit einem um eine Nadel gewickelten Wattebausch entnommen wird, geschieht am besten mit Hämatoxylin-Eosin.

c) Die Technik von Klussmann und Simola 81). Kastrierte Rattenweibchen werden 1 Woche nach der Operation auf eine A-freie Diät gesetzt. Gewicht der Tiere 40—60 g. Die ersten Abstriche (nach 3 Wochen) zeigen reichlich Schleim und Leukozyten, also das normale Bild des kastrierten Tieres. Allmählich treten Schollen auf. Zuletzt findet man 100%iges Schollenstadium. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß der Daueröstrus schon zu einer Zeit erscheint, in der die Tiere noch regelmäßig wachsen. 5—6 Tage nach Beginn des reinen Schollenstadiums wird die zu prüfende Substanz in Öl verabreicht. Rückgang der Schollen beweist die A-Wirksamkeit der Substanz.

81) Klussmann-Simola, Biochem. Z. 258, 195 (1933).

Tabelle 14. (Nach Laquer und Mitarbeiter)

Zeit der Prüfungen	Zahl der Prüfungen	Dosis in mg	Wirkungszahlen Einzelwerte	Durchschnitt	
Dezember 1931	6	200	1200, 1100, 1800, 2100, 1500, 1000	1500	1800
Juni 1932	6	200	1800, 1100, 3500, 2800, 2100, 1750	2050	
Aug.—Okt. 1931	20	100	1250, 1350, 1150, 400, 900, 1600, 1300, 500, 300, 250, 1000, 250, 450, 900, 600, 900, 1150, 400, 500, 800	800	
Okt.—Dez. 1931	20	100	350, 300, 250, 950, 300, 1700, 1300, 500, 500, 1050, 800, 600, 3200, 850, 300, 200, 550, 350, 300, 500	750	
Jan.—April 1932	20	100	1650, 1000, 2300, 900, 600, 500, 1400, 850, 2200, 400, 400, 600, 400, 350, 400, 400, 400, 400, 950, 400	800	800
Juni—Juli 1932	20	100	650, 200, 500, 800, 1800, 400, 1700, 700, 400, 800, 1100, 700, 600, 650, 1550, 750, 800, 600, 200, 950	850	
Aug.—Sept. 1932	22	100	1000, 800, 1150, 2050, 1000, 1850, 550, 300, 1100, 2500, 800, 500, 350, 750, 750, 300, 500, 550, 850, 700, 1000, 750	900	
Oktober 1931	12	50	200, 400, 100, 200, 250, 500, 100, 500, 300, 100, 200, 100	250	400
Juli—Aug. 1932	8	50	600, 500, 200, 600, 1900, 150, 350, 200	550	
Okt.—Dez. 1931	9	25	150, 100, 100, 200, 150, 200, 300, 100, 300	200	
Jan.—April 1932	18	25	200, 150, 100, 0, 100, 50, 200, 200, 0, 50, 50, 600, 350, 100, 150, 200, 150, 0	150	200
Juli 1932	4	25	400, 300, 400, 0	300	
Okt.—Dez. 1931	12	10	0, 0, 0, 100, 0, 0, 50, 100, 150, 50, 0, 0,	50	

Carotin bewirkt in Dosen von 1 γ nach 9 Tagen Auftreten der Leukozyten. Nach Verabreichung von 2,5 γ erscheinen sie nach 5 Tagen und nach 5 γ schon in 3 Tagen. Vollständiger Rückgang des Schollenstadiums wurde erreicht nach 1 γ Carotin in 16 Tagen, nach 2,5 γ in 11 Tagen und nach 5 γ in 12 Tagen. Auch Baumann 82) gibt eine Versuchstechnik an, die sich aber nicht wesentlich von den beschriebenen unterscheidet.

6. Der Resistenztest von Boynton und Bradford 83)

Der vielleicht empfindlichste Test auf das Vitamin A ist der Resistenztest von Boynton-Bradford. Schon lange vor Eintreten des Wachstumsstillstands ist die Resistenzverminderung bei der Avitaminose A nachweisbar. Ein

82) Baumann, Science (N. Y.) 1932, 420.
83) Boynton-Bradford, J. of Nutrit. 4, 323 (1931).

sonst harmloser Rattensaprophyt, der Bac. mucosus capsulatus, wird pathogen, wenn man ihn 4 Wochen A-frei ernährten Ratten intraperitoneal injiziert (Dosen von 0,25—0,4 ccm einer 1 : 10 verdünnten Bouillonkultur). Kleinste Vitamin A-Mengen sind imstande, die Resistenzverminderung zu verhüten.

Nachprüfungen der Methoden liegen bisher nicht vor.

IV. Die chemischen Methoden zur Bestimmung des Vitamins A

Neben den biologischen Methoden zur Bestimmung des Vitamins A kennen wir auch einige chemische Reaktionen, die imstande sind, in manchen Fällen den Tierversuch zu ersetzen. Die hauptsächlichen dieser Methoden wurden von Fearon 84), Bezssanoff 85) und Carr-Price 86) angegeben.

Der Pyrogalloltest von Fearon beruht auf der Blaufärbung eines Vitamin A-haltigen Öles mit Pyrogallol. Die Reaktion ist aber wahrscheinlich unspezifisch 87), 88), 89) und kaum in Gebrauch. Bezssanoff zieht die Erscheinung, daß A-haltige Öle sich mit Molybdän-Phosphorwolframsäure intensiv blau färben, zum Nachweis heran. Der weitaus beste und gebräuchlichste Test ist die Reaktion von Carr und Price, die auf der Blaufärbung einer A-haltigen Lösung mit Antimontrichlorid beruht.

A. Die Carr-Price-Reaktion

1. Allgemeines

Beobachtungen über die Farbreaktionen verschiedener Öle mit Schwefelsäure, Arsen- und Antimonchloriden bildeten die Grundlage für die Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode für das Vitamin A.

An Stelle der von Rosenheim und Drummond 90) verwandten Arsenverbindung ist man heute allgemein dazu übergegangen, die entsprechende Antimonverbindung anzuwenden. Man geht hierbei so vor, daß man das zu prüfende Öl mit einer Lösung von Antimontrichlorid versetzt und die entstehende Farbe gegen abgestufte Blaugläser oder gegen Standardlösungen mißt. Die Methode ist nur für konzentrierte Lösungen brauchbar, wie sie z. B. im Lebertran vorliegen. Aus anderen Substanzen ist das Vitamin vorher zu extrahieren und anzureichern. Pflanzliche Pigmente stören die Reaktion (Lykopin, Bixin, Crocetin). Die Methode versagt bei der lykopinreichen Tomate. Die Reaktion ist für das Vitamin A spezifisch. Das A-wirksame Carotin gibt eine 20mal schwächere Blaufarbe.

Die Farbtiefe ist bei höheren Konzentrationen keine lineare Funktion des Vitamin A-Gehalts des Lebertrans. Deshalb empfiehlt es sich, wenn man nicht den Fehler dieser Bestimmung bei kleinen Konzentrationen mit in den Kauf nehmen will, den Tran nach einer der bekannten Methoden zu verseifen und das Unverseifbare, das mit Äthylendichlorid, Chloroform oder Petroläther

---

84) Fearon, Biochemic. J. 19, 888 (1925).
85) Bezssanoff, Bull. Soc. Chim. biol. Paris 11, 294 (1929).
86) Carr c. s., Biochemic. J. 20, 497 (1926).
87) Moore, Lancet 2, 219 (1929).
88) Willomot-Wokes, Lancet 2, 8 (1927).
89) Rosenheim-Webster, Lancet 2, 806 (1926); Biochemic. J. 20, 1342 (1926).
90) Rosenheim c. s., Biochemic. J. 19, 753 (1925).

ausgeschüttelt wird, in Chloroform gelöst, zu untersuchen. Kleine Mengen von Äthylendichlorid oder Petroläther stören die Reaktion nicht. Diese Methode ist um so vorteilhafter, als gewisse Öle, durch darin enthaltene störende Substanzen, die Ergebnisse erheblich beeinflussen können.

2. Herstellung der Chloroformlösung des Antimontrichlorids

Reines Chloroform wird 2—3mal mit Wasser gut ausgeschüttelt und dann über geglühter Pottasche getrocknet. Das Chloroform wird destilliert, wobei die ersten 10% des Destillates verworfen werden. Während Trocknung und Destillation ist die Lösung vor Lichtzutritt zu schützen. Das Antimontrichlorid wird mit dem reinen Chloroform gewaschen, bis die Lösung farblos abläuft und darauf über Schwefelsäure getrocknet. Aus den beiden reinen Bestandteilen stellt man sich eine bei 20° gesättigte Lösung her, die etwa 21—23% Antimontrichlorid enthält. Sie ist in braunen Flaschen mit Glasverschluß etwa 4 Wochen haltbar **91)**. Peinlichste Sauberkeit vor Verunreinigung mit Wasser ist Vorbedingung!

Gutzeit **92)** gibt neuerdings ein anderes Reagens an, mit dem aber nicht genügende Erfahrungen vorliegen, um zu entscheiden, ob es gegenüber dem beschriebenen erhebliche Vorteile bietet. Die Lösung enthält neben Antimon auch Arsentrichlorid und Hydrochinon zur Haltbarmachung.

3. Ausführung der Reaktion

2 g des zu untersuchenden Lebertrans werden genau abgewogen und im Meßkolben mit reinem Chloroform auf 10 ccm aufgefüllt. Man gibt 0,2 ccm dieser Lösung (abgemessen mit einer 1-ccm-Pipette von 15 cm Länge) in den 10-mm-Trog des Kolorimeters. Nach Einsetzen der Küvette in den Apparat gibt man weiter 2 ccm der Antimonchloridlösung hinzu und rührt mit einem Glasstab gut um. Die Ablesung muß schnell erfolgen, da die Farbtiefe nach 10 Sekunden ein Maximum erreicht. Die Bestimmung erfolgt durch Vorschalten farbiger Gläser (gelb, rot, blau) bis zur Übereinstimmung des Farbtones. Man nimmt nach 4—5 Ablesungen den Mittelwert, wobei jedesmal der Ansatz in der Küvette erneuert wird.

In der beschriebenen Weise (20 mg Öl auf 1 ccm Reagens) muß ein guter Lebertran einen Wert von 10 Blaueinheiten geben. Nach Rosenheim-Webster (l. c. 89) ist dieser Wert gleich 1 C.L.O. (cod liver oil). Die Ermittlung der C.L.O.-Zahl ergibt sich aus der Beziehung:

$$\frac{\text{20mal abgelesene Blaueinheiten}}{\text{Milligramm der zu testenden Substanz in Kubikzentimeter}} = \text{C.L.O.}\ \textbf{93)}$$

Die Ablesung erfolgt nach der Stoppuhr, am besten immer nach 30 Sekunden **94)**.

Verseift man einen Tran und führt die Reaktion mit dem Unverseifbaren aus, so bekommt man für 1 ccm Reaktionsgemisch schon mit 10 mg einen Wert

91) Evers, Quart. J. Pharmakol. 2, 227, 566 (1929).
92) Gutzeit, Arch. Sci. Phys. et Nat. Gén. 9, 155 (1927).
93) Report of the C.L.O. Coulour Test Subkomm. London 1931.
94) Everdingen, Proc. roy. Acad. Amsterdam 35, 1339 (1932).

von 10 Blaueinheiten 95). Für den Vergleich der Wirkung des Vogans mit der Blaufarbe muß dieser Wert herangezogen werden, um Übereinstimmung zu bekommen. Der Farbtest ist bei Blauwerten über 10 weniger gut durchzuführen als bei kleineren. Bei höheren Konzentrationen besteht kein Verhältnis zwischen Farbe und A-Gehalt. Coward u. a. empfehlen eine Ablesung bei 4—6 Blauwerten. Bei Bestimmung des Blauwerts von Vogan erhält man in 0,1%iger Lösung einen Wert 10 Blau + 4 Gelb (0,2 ccm Vogan — 2 ccm Reagens). Bei Bestimmung in 0,5%iger Lösung ergibt sich 6,5 Blau + 2,5 Gelb (0,1 ccm Vogan — 2 ccm Reagens).

Als Lichtquelle für die Ablesung nimmt man eine 40-Watt-Osram-Nitra-Milchglaslampe für 220 Volt, deren Licht durch einen dahintergestellten weißen Milchglasrückstrahler reflektiert wird (Laquer und Mitarbeiter). Die Ablesegenauigkeit beträgt für verschiedene Personen 0,5 Blau.

Die oben angegebene Einheit von 20 mg Lebertran wurde gewählt, weil diese Mengen im Testversuch auf Vitamin A gerade 1 Sherman-Einheit entspricht. 1 C.L.O. ist also gleich 1 Sherman-Einheit.

4. Die Kolorimeter

Für die Carr-Price-Reaktion kann jedes beliebige Kolorimeter benutzt werden. Gewöhnlich wird die Reaktion in dem Lovibond-Tintometer von Rosenheim und Schuster 96) ausgeführt, das durch die „Tintometer Ltd.", Salisbury, England, für 12 engl. Pfund (!) bezogen werden kann. Das Tintometer besteht im wesentlichen aus einem Okular, hinter dem zwei Öffnungen angebracht sind. Vor die eine Öffnung kommt die Küvette mit der zu untersuchenden Lösung, vor die andere setzt man solange standardisierte Gläser in Rot, Gelb und Blau, bis beide Farbtöne übereinstimmen. Eine eingehende Beschreibung liegt dem Apparat bei. Die Berechnung der Blauwerte ergibt sich durch Addition der für die vorgeschalteten Gläser geltenden Kennzahlen. Gelbe oder rote Zusatzgläser werden nicht berücksichtigt.

Als Ersatzinstrument haben Kuhn-Brockmann 97) ein Mikro-Hellige-kolorimeter verwandt und messen mit gutem Erfolg die Blauwerte gegen Lösungen von Kupfersulfat und Kobaltnitrat. Bleyer und Mitarbeiter (l. c. 103) benutzen das Authenrieth-Kolorimeter in der gewöhnlichen Form und messen gegen Viktoriablaulösung. Auch das Stufenphotometer von Zeiss hat sich ausgezeichnet bewährt. Die blaue Farbe der Antimonreaktion zeigt dabei die größte Absorption zwischen 550 und 600 mμ. Emmerie-Julius-Wolff 98)) arbeiten mit Filter „S 61". Es ist dabei zweckmäßig, das Kolorimeter durch eine Hilfskraft füllen zu lassen, um sofort auf Farbgleichheit einstellen zu können. Die Apparatur hat den Vorteil, ohne Vergleichslösung zu arbeiten. Man eicht mit einem Standardlebertran, stellt eine Konzentrationskurve auf und kann aus jeder Ablesung sofort den Wirkungswert ermitteln. Logarithmische Kurven ergeben für die aufeinanderfolgenden Konzentrationen eine gerade Linie.

B. Modifikationen der Carr-Price-Reaktion

1. Methode von Norris-Church 99). Die Modifikation beruht auf Einführung einer gekühlten Lösung von Antimontrichlorid. Nach Abkühlung der gesättigten Lösung in Eiswasser resultiert eine etwa 18%ige, mit der die Reaktion

95) Coward c. s., Biochemic. J. 25, 1102 (1931).
96) Rosenheim c. s., Biochemic. J. 21, 1329 (1927).
97) Kuhn c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 1862 (1931).
98) Emmerie c. s., Neederl. Tijdschr. Geneesk. 1933, 605.
99) Norris c. s., J. of biol. Chem. 85, 477 (1929); 89, 421 (1930); J. of Nutrit. 5, 495 (1932).

ausgeführt wird. 0,3 ccm der zu untersuchenden Lösung werden in die Küvette des Lovibond-Kolorimeters gebracht, mit 3 ccm der gekühlten Lösung versetzt und der Farbwert nach 15—30 Sekunden abgelesen.

Die Modifikation soll den Vorteil haben, daß bei der niedrigen Temperatur die Farbe sich besser hält. Bei Anwendung der Methode ist zu beachten, daß hier die Blauwerte von einer anderen Größenordnung sind als beim vorhergehenden Versuch. Hier entsprechen 1 Sherman-Einheit (derjenigen Menge, die im 8-Wochen-kurativen-Test eine Gewichtszunahme von 25 g verursacht) etwa 2,18 Lovibond-Einheiten.

2. Methode von Morgan 100). Bessere Ergebnisse als nach der oben beschriebenen Methode soll man erzielen, wenn man bei der Ablesung am Lovibond-Kolorimeter nicht nur die Blauwerte bestimmt, sondern den Wert blau minus gelb. In diesem Fall scheinen die störenden Einflüsse verschiedener Begleitstoffe ausgeschaltet zu sein, da man so auch eine ziemliche Übereinstimmung zwischen Lebertran und Unverseifbarem findet. Nachprüfungen der Methode liegen nicht vor.

3. Methoden von Smith-Hazley 101) und Moore 102) u. a. Die genannten Autoren beschreiben Modifikationen der Carr-Price-Reaktion, die im wesentlichen auf Verseifung des Öls und Einführung neuer Berechnungsmethoden beruhen. Einzelheiten s. Original.

Rosenthal 102a) und Mitarbeiter empfehlen bei Ausführung der Farbreaktion auf Vitamin A den Zusatz von Brenzcatechin. Es entsteht zunächst eine blaue, dann eine rote Färbung. Da Carotin eine Blaufärbung gibt, können Vitamin A und Carotin nebeneinander bestimmt werden. Als Vergleichslösung dient Kaliumpermanganat.

4. Methode von Bleyer-Schlemmer-Müller=Parchem 103)

An Hand von Versuchen mit dem Stufenphotometer bestimmen die Autoren die größte Absorption der blauen Farbe der Carr-Price-Reaktion und ändern das Authenrieth-Kolorimeter so um, daß es durch Einschaltung einer blauen Glasscheibe nur Licht von 550—600 mμ durchläßt.

Das Kolorimeter wird zusammen mit einer Osram-Nitra-Opallampe von 100 Watt auf ein Brett fest aufmontiert. Die Lampe steht etwa 10 cm hinter dem Instrument. Nur das Glasfenster darf beleuchtet werden. Die Lichtquelle wird so abgedeckt, daß kein Licht von oben in das Kolorimeter fällt. Der Glaskeil des Kolorimeters wird mit einer Lösung von Viktoriablau 1 : 300000 gefüllt. 0,5 ccm Lebertran werden genau abgewogen, mit gereinigtem Chloroform auf 10 ccm aufgefüllt und in eine Mikrobürette gebracht. Eine zweite Mikrobürette enthält die Antimonlösung. Man läßt beide Lösungen nacheinander in die Küvette des Kolorimeters fließen und gibt die Antimonlösung dabei in einer solchen Menge zu, daß der Trog insgesamt 2 ccm Lösung enthält. Bei Zugabe von 0,2 ccm der Öllösung benötigt man also 1,8 ccm der Antimonlösung usw.

Nach Beendigung der Zugabe mischt man schnell und stoppt mit einer Uhr genau 60 Sekunden ab. Dann erfolgt die Ablesung. Der Wert entspricht der Schichtdicke in Millimeter. Konzentration und Schichtdicke sind direkt proportional.

Auswertung der Ergebnisse: Durch Eichung des Hellige-Kolorimeters mit den Glasplatten des Lovibond-Apparates ergab sich für 1 Lovibond-Einheit ein Wert von 2 mm Schichtdicke des Keils.

---

100) Morgan, Biochemic. J. 26, 377 (1932).
101) Smith-Hazley, Biochemic. J. 24, 1942 (1930); 27, 17 (1933).
102) Moore, Biochemic. J. 24, 692 (1930).
102a) Rosenthal, Biochem. Z. 267, 119 (1933); Biochemic. J. 28, 41 (1934).
103) Bleyer-Schlemmer-Müller=Parchem, Arch. der Pharmaz. 566, 269 (1931).

Tabelle 15. Bestimmung von VA in verschiedenen VA-haltigen Produkten mit Hilfe der Antimontrichloridreaktion im Hellige-Kolorimeter

Präparat	Angewandte Menge der Chloroformlösung = mg des Präparates	Abgelesene Kolorimeterwerte in Millimeter Schichtdicke nach Sekunden									
		30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
I. Norweg. Standard-Lebertran 1931, DAB. VI	0,1 ccm = 5,27 mg	3,8	3,5	3,4	3,2	3,1	2,8	2,6	2,5	2,4	2,3
	0,2 ,, = 10,54 ,,	7,4	7,1	6,7	6,4	6,1	5,65	5,3	5,0	4,8	4,5
	0,3 ,, = 15,81 ,,	10,8	10,4	10,0	9,5	8,9	8,4	7,8	7,5	7,1	6,9
II. Norweg. Standard-Lebertran 1929, DAB. VI	0,1 ,, = 5,05 ,,	3,5	3,5	3,4	3,4	3,5	3,45	3,4	3,5	3,4	3,4
	0,2 ,, = 10,10 ,,	6,8	6,9	7,0	6,9	6,9	6,85	6,8	6,8	6,75	6,75
	0,3 ,, = 15,15 ,,	10,4	10,45	10,3	10,3	10,2	10,3	10,35	10,2	10,3	10,2
III. Deutscher Med.-Lebertran 1931, DAB. VI	0,1 ,, = 5,04 ,,	3,2	3,25	3,2	3,1	3,05	2,9	2,85	2,7	2,7	2,7
	0,2 ,, = 10,08 ,,	6,4	6,4	6,3	6,2	6,0	5,8	5,8	5,5	5,4	5,3
	0,3 ,, = 15,12 ,,	—	9,6	9,4	9,0	8,8	8,5	8,4	8,2	8,0	7,9
	0,4 ,, = 20,16 ,,	—	—	12,7	12,1	11,7	11,2	10,8	10,5	10,3	10,0
IV. Japan. „Dorsch"-Lebertran	0,1 ,, = 0,821 ,,	4,6	4,3	3,9	3,6	3,3	3,2	2,95	2,8	2,6	2,5
	0,2 ,, = 1,642 ,,	9,2	8,7	8,0	7,3	6,8	6,4	6,0	5,5	5,3	5,0
V. Carotin „Karrer"	0,1 ,, = 0,0208 mg	7,2	7,1	7,0	6,8	6,7	6,6	6,5	6,35	6,3	6,2
VI. Ein „Va"-Handels-Präparat	0,1 ,, = 0,189 ,,	2,8	2,7	2,55	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8
	0,2 ,, = 0,378 ,,	5,7	5,4	5,2	5,0	4,7	4,4	4,1	3,9	3,7	3,6
VII. Hai-Lebertran	0,1 ,, = 1,065 ,,	3,8	3,4	3,3	3,1	2,9	2,7	2,6	2,4	2,3	2,1
	0,2 ,, = 2,13 ,,	7,2	6,8	6,5	6,1	5,7	5,4	5,2	4,9	4,6	4,2
VIII. Vieh-Lebertran, extra hell, filtriert	0,1 ,, = 5 ,,	6,3	6,0	5,7	5,5	5,2	5,0	4,8	4,6	4,5	4,4
IX. Vieh-Lebertran, hell, filtriert	0,1 ,, = 5,05 ,,	5,8	5,4	4,9	4,5	4,2	3,9	3,7	3,5	3,2	2,9
	0,2 ,, = 10,1 ,,	11,5	10,9	10,0	9,2	8,5	7,9	7,4	7,0	6,5	6,0
X. Frische Butter (Werte berechn. aus der Unverseifbaren)	0,1 ,, = 200 ,,	3,4	3,3	3,2	3,1	3,0	3,0	2,9	3,0	2,9	2,9
	0,2 ,, = 400 ,,	6,6	6,4	6,3	6,2	6,1	6,0	6,0	6,0	5,9	6,0

Anmerkung: Die angegebenen Werte stellen das Mittel der Ablesungen zweier paralleler Versuchsreihen dar. Der Fehler bei der Einzelablesung liegt allgemein bei mittlerer Schichtdicke in einer Grenze von $\pm$ 5%, abnehmend mit steigender und zunehmend mit fallender Schichtdicke.

20 mg Tran entsprechen für 1 ccm Reagenzlösung nach Carr-Price = 10 Lovibond-Einheiten.

10 Lovibond-Einheiten = 1 C.L.O.

Denselben Wert von 10 Lovibond-Einheiten geben 0,035 mg Carotin.

20 mg Tran entsprechen also = 0,035 mg Carotin in ihrem Blauwert. (Die Werte für 2 ccm Reagensgemisch sind entsprechend zu ändern.)

Mit dem Hellige-Kolorimeter wurde für 2 ccm Gemisch für 10 mg Tran ein Wert von 7,0 mm gefunden. Denselben Wert gaben 0,0208 mg Carotin.

Nach dieser Methode entsprechen also 10 mg Tran = 0,0208 mg Carotin.

Die für verschiedene Lebertransorten gefundenen Werte gehen aus folgenden Tabellen hervor. Die Werte können in Schichtdicken für 1 g des untersuchten Stoffes angegeben werden. Besser wäre eine Berechnung nach „Carotinwerten“. Ein solcher Wert wäre diejenige Carotinmenge in Milligramm, deren Farbwert dem Farbwert von 1 mg des untersuchten Stoffes gleich wäre. Für Carotin ist dieser Wert = 1000.

Tabelle 16. (Nach Bleyer und Mitarbeiter.) Vergleich verschiedener VA-haltiger Stoffe mittels der Antimontrichloridreaktion. Ablesezeit nach 1 Minute

Präparat	Menge und Schichtdicke	Kolorimeterwert pro g	Carotinwert pro g
1. Norw. Standard-Lebertran 1931, DAB. VI	10,54 mg = 7,1 mm	676 mm	1,99
2. Norw. Standard-Lebertran 1929, DAB. VI	10,1 „ = 6,9 „	683 „	2,00
3. „Deutscher“ Med.-Lebertran, 1931, DAB. VI . .	10,08 „ = 6,4 „	634 „	1,86
4. Japanisch. „Dorsch“-Lebertran	1,642 „ = 8,7 „	5305 „	15,54
5. Carotin „Karrer“	0,0208 „ = 7,1 „	341346 „	1000,00
6. Ein „VA“-Handelspräparat	0,378 „ = 5,4 „	14444 „	42,34
7. Hai-Lebertran	2,13 „ = 6,8 „	3192 „	9,36
8. Vieh-Lebertran, „extra hell“, filtriert	5,0 „ = 6,0 „	1200 „	3,52
9. Vieh-Lebertran, „hell“, filtriert	10,1 „ = 10,9 „	1080 „	3,17
10. Ein deutscher Markentran, DAB. VI	9,65 „ = 5,3 „	555 „	1,63
11. Ein ausländischer Markentran, DAB. VI	10,0 „ = 6,2 „	620 „	1,82
12. Med.-Tran aus einer Apotheke (Stichprobe) DAB. VI	10,01 „ = 9,5 „	950 „	2,79
13. Butter (frische Sommerbutter, Wert berechnet aus dem Unverseifbaren . .	400 „ = 6,4 „	16 „	0,047 = $^1/_{50}$ mittl. Lebertranwert
14. Med.-Tran. Norweg. Standard-Tran 1929, 12 Monate unter Zusatz weniger Tropfen Wasser bei Lichtzutritt gelagert	**Keine Reaktion mehr, vollständig verdorben im Sinne der Versuchsanordnung**		

C. Die Bestimmung des Vitamins A in Organen 108), 108a)

1. Die Bestimmung des Vitamins A in der Leber nach Wilson 104)

Die Methode beruht auf der Behandlung des zerkleinerten Lebergewebes mit der dreifachen Menge 94%igen Alkohols und Trocknung des Rückstandes bei 95°. Die getrocknete Leber wird 24 Stunden mit Äther extrahiert, der Äther im Vakuum verdampft und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Mit dieser Chloroformlösung wird die Carr-Price-Reaktion nach den oben gegebenen Richtlinien ausgeführt. Der Autor hat auch gegen eine $^1/_{5000}$ Lösung von Viktoriablau gemessen, wobei er diese Farbtiefe als 1 Einheit festsetzte.

2. Die Bestimmung des Vitamins A in der Leber nach Laqueur 105)

Die Methode von Laqueur und Mitarbeiter ist bedeutend einfacher. 5 g Leber werden mit 20 g wasserfreiem Natriumsulfat in einem Mörser gut verrieben. Das trockene Gemisch wird im Soxlethapparat 3—4mal mit Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformlösungen im Vakuum eingeengt. Nach Auffüllen der Lösung auf ein bestimmtes Volumen, etwa 10 ccm oder weniger, stellt man mit 0,2 ccm die Carr-Price-Reaktion an. Dabei ist selbstverständlich Wasserfreiheit der Lösungen Voraussetzung. Die Methode hat auch bei der A-Bestimmung in Lebertranemulsionen gute Werte gegeben. Die gefundenen Mengen werden am besten auf einen Standardtran mit 100 E. in Kubikzentimeter bezogen. Wenn eine Leber 40 E. A besitzt, so bedeutet das, daß 1 g Leber ebensoviel Vitamin A hat wie 0,4 g des Standardlebertrans. Die Methode ist für alle Organe anwendbar. Sie ergibt etwas höhere Werte als die Wilsonsche.

Man hat mit ihrer Hilfe festgestellt, daß Schweineleber nur wenig Vitamin A hat, während Rinderleber daran reicher ist. Von dem gesamten Vitamin A-Vorrat des Organismus finden sich etwa $^9/_{10}$ in der Leber. Die Leber enthält eine 200- bis 400mal größere Vitaminmenge als der Muskel. In Niere und Lunge ist die Menge an Vitamin 40mal so groß als im Muskel. Der A-Gehalt der frischen Leber ist am größten. Am A-reichsten erwiesen sich die Leber von Steinbutt und Makrelen (v. Euler **106)**). Selbstverständlich kann die Reaktion auch mit dem Unverseifbaren der Leber ausgeführt werden **107)**.

D. Die Bestimmung des Vitamins A im Blut

Menken (l. c. 108) gibt eine Methode zur A-Bestimmung im Blut. Danach werden 20 ccm Serum mit der 10fachen Menge 96%igem Alkohol gefällt und zentrifugiert. Der Rückstand wird wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt und das Volumen des Petroläthers auf 1 ccm reduziert. Man bestimmt dann im Lovibond-Kolorimeter den Gehalt an Carotin (Gelbwert). Dann erfolgt eine weitere Einengung auf 0,2 ccm und eine Bestimmung des Blauwerts.

---

104) Wilson, Biochemic. J. 21, 1055 (1927).
105) Laqueur c. s., Dtsch. med. Wschr. 1928, 1495.
106) v. Euler c. s., Biochem. Z. 245, 252 (1932).
107) Moore, Lancet 1932, 669.
108) Vgl. weiter Menken, Dtsch. med. Wschr. 1932, 1484 und Wolff, Lancet 2, 617 (1932).
108a) Brockmann c. s., Z. physiol. Chem. 221, 117 (1933).

10 ccm Serum geben gewöhnlich 0—8,4 Lovibond Blau und 1,1—6,5 Gelb. Der aus dem Carotinwert errechnete Gehalt wird von der Bestimmung des A-Vitamins abgezogen.

v. Euler und Virgin (l. c. 106) bestimmen das Vitamin A im Serum durch Extraktion mit Äther und Aufnehmen des Ätherrückstandes im Chloroform. Reaktion wie oben. Das Serum von Meerschweinchen und Ratten gibt keine Reaktion.

Lundborg **109)** modifiziert die Gottlieb-Röse-Methode für die A-Bestimmung. Nach seiner ersten Vorschrift werden 50 ccm defibriniertes Blut 6mal mit je 100 ccm Äther ausgeschüttelt, die Extrakte über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in 5 ccm Chloroform gelöst und mit dieser Lösung die Lovibond-Bestimmung ausgeführt. Nach der Ammoniakmethode wird das Blut zunächst mit konzentriertem Ammoniak versetzt (50 ccm defibriniertes Blut + 2,5 ccm Ammoniak). Zu dem Brei gibt man 50 ccm Äther und 50 ccm Petroläther. Die Lösung wird zentrifugiert und der Rückstand von neuem mit Petroläther ausgezogen. Die Lösungen werden vereinigt und das Vitamin A bestimmt. Besser ist die Verwendung verdünnten Blutes (50 ccm Blut + 50 ccm destilliertes Wasser), da hier der Extrakt gewöhnlich schon nach der zweiten Extraktion farblos ist.

Interessant ist die Feststellung, daß Blutkörperchen keine mit Antimontrichlorid reagierenden Substanzen enthalten.

E. Blauwerte verschiedener Substanzen

Die Aktivität ist in Blauwerten ausgedrückt für:

β-Carotin	7 000
Vitamin A .	110 000—150 000
Xanthophyll	4 100
Dihydrocrocetin	24 000

10 Blaueinheiten werden von 20 mg Lebertran + 0,08 ccm Chloroform + 1 ccm Antimontrichlorid im 10-mm-Trog des Kolorimeters gegeben.

Der C.L.O.-Wert verschiedener Leberöle beträgt nach Karrer bei

Heilbutt (Hippoglossus)	200
Huhn	75
Meerschweinchen . . .	5
Steinbutt	800
Makrelenhecht	500
Vitamin A, reinstes . .	9 500

Der Wert ist bei gewöhnlichem Dorschlebertran etwa 1—3. Fischleberöle enthalten im Sommer 20—30mal größere A-Mengen als im Winter.

F. Fehlerquellen der chemischen Vitaminbestimmungen

Neben den Fehlerquellen, die das rasche Arbeiten mit sich bringt, selbst bei peinlichstem Arbeiten unter Vermeidung aller Spuren Wasser, bleiben noch unvermeidbare Fehler, die in der Natur der untersuchten Lebertrane liegen.

Lebertran enthält Stoffe, die die Reaktion nach Carr-Price hemmen **110)**. Einen dieser Stoffe hat man isoliert. Es ist eine ungesättigte Säure, etwa der Zusammensetzung $C_{21}H_{36}O_3$. Die Substanz ist ölförmig und ließ sich aus 1 Liter Tran in einer Menge von 2,5 ccm gewinnen. Sie hemmt die Reaktion

109) Lundborg, Biochem. Z. 258, 325 (1933).

110) Emmerie, Nature (Lond.) 1, 364 (1933); Acta brev. neerl. Physiol. 2, 156 (1933); Proc. roy. Soc. Amsterdam 35, 1347 (1932).

zwischen Vitamin A und Antimonchlorid schon in kleinsten Mengen. Verseifung zerstört die Substanz.

Die Ausführung der Reaktion mit pflanzlichen Stoffen kann Schwierigkeiten bereiten, da man diese zunächst extrahieren und das Vitamin anreichern muß, aber auch deshalb, weil sie Pigmente enthalten, die die Reaktion stören. Dasselbe ist bei Butter und Eigelb der Fall. Zunächst gibt Carotin auch die Reaktion nach Carr-Price **111)**. Dann enthalten diese Substanzen Pigmente, die man vorher durch Adsorption entfernen muß. Willimot-Wokes nehmen z. B. für eine Petrolätherlösung des Unverseifbaren aus 100 g Butter 10 g Kohle und schütteln diese Mischung mehrere Stunden lang. Dann sind die meisten Pigmente entfernt.

Bemerkenswert ist, daß Dihydro-α-Carotin, das weniger gefärbt ist als Carotin und darin dem Vitamin A nähersteht, auch die Carr-Price-Reaktion in stärkerem Maße gibt als Carotin. Weiter konnte Seel **112)** durch vorsichtige Oxydation von Cholesterin wirksame A-Präparate gewinnen, die auch die Carr-Price-Reaktion liefern. Das erinnert an frühere Befunde von Takahashi, der aus dem Unverseifbarem des Lebertrans ein Cholesterinderivat isolierte und für identisch mit dem Vitamin A hielt.

Pummerer und Rebmann behaupten, daß auch zerstörtes, A-unwirksames Carotin die Reaktion liefert. Bei Beurteilung der Werte ist also Vorsicht geboten. Eine Bestätigung durch den biologischen Versuch ist unumgänglich. Als Kontrolle der Fabrikation oder als Auswahlversuch für die zu verarbeitenden Transorten wird die Reaktion aber gute Dienste leisten.

Corbet **112a)** gibt neuerdings eine ganze Liste der Substanzen, die die Carr-Price-Reaktion beeinflussen.

G. Übereinstimmung zwischen biologischem Test und Farbreaktion

Die Übereinstimmung zwischen Tierversuch und Farbreaktion ist innerhalb gewisser Grenzen recht gut. Widersprechende Ergebnisse konnten nicht bestätigt werden. Allerdings geben gewöhnlich sehr hochwirksame Trane im biologischen Versuch eine geringere Wirkung als ihrer C.L.O.-Zahl nach zu erwarten wäre (Morgan **113)**). Es ist nach wie vor zu fordern, daß das Ergebnis der chemischen Untersuchung durch den Tierversuch kontrolliert wird.

V. Die spektroskopische Untersuchung auf Vitamin A

Die Absorptionsspektrometrie ist im allgemeinen für die schnelle Auswertung der Vitamine nicht brauchbar, teils wegen der zu hohen Anschaffungskosten der Apparate, teils wegen der nicht immer leichten Handhabung. Immerhin sei angegeben, daß Bills **114)** einen Spektrographen speziell für die schnelle Bestimmung des Vitamins A angegeben hat.

---

111) v. Euler c. s., Z. physiol. Chem. 157, 263 (1926); Biochem. Z. 208, 73 (1929).
112) Seel, Arch. of exper. Path. a. Pharm. 159, 93 (1931).
112a) Corbet, J. of biol. Chem. 100, 657 (1933).
113) Morgan, Biochemic. J. 26, 377 (1932).
114) Bills, J. Biol. Chem. 100, 15 (1933).

Das Vitamin A absorbiert selektiv im UV. bei 320—330 mμ (Duliere **115)**, Morton und Mitarbeiter **116)**). Carotin zeigt keine UV.-Absorption. Der aus Vitamin A mit Antimontrichlorid entstehende blaue Farbstoff hat bei 608—612 mμ eine charakteristische Absorptionsbande. Der mit Carotin entstehende Körper absorbiert bei 590 mμ. Neuerdings (l. c. 110) hat man aus der blauen Farblösung des Vitamins A durch Adsorption an Fullererde zwei Chromogene trennen können, von denen nur das bei 610 mμ absorbierende Vitamin A-Wirkung hat.

Man kann bei der spektrophotometrischen Bestimmung des Vitamins A zwei Wege gehen. Einmal kann man die Absorption des Vitamins im UV. messen, und ein anderes Mal die der mit Antimontrichlorid entstehenden blauen Lösung. Die Methode von Chevallier c. s. **117)** beruht auf der Anwendung eines UV.-Quarz-Monochromators, an dessen Ende eine photoelektrische Kaliumzelle sitzt, die mit einer fluoreszierenden Substanz bedeckt ist. Der durch die Fluoreszenz hervorgerufene Strom wird mit einem Galvanometer gemessen. Da eine konstante Beziehung zwischen der UV.-Strahlung, der Fluoreszenzintensität und dem photoelektrischen Strom besteht, kann man die UV.-Absorption jeder in den Strahlengang eingeschalteten Substanz messen. Die Autoren nehmen als Lösungsmittel Hexan und entfernen vorher aus dem Lebertran störende Pigmente und freie Fettsäuren durch Extraktion mit Alkohol in saurer Lösung. Die erhaltenen Werte stehen, wie folgende Tabelle zeigt, in guter Übereinstimmung mit denen des biologischen Versuchs.

Tabelle 17. (Nach Chevallier)

No. of group	Sample	Absorption of sample at 3280 Å. log I_0/I 1 % 1 cm	Dilution of the samples	Daily dose per animal mg	Gain in weight per week (mean) g	Difference %
0	1	0,950	1	5	5,11	—
30	13	12,5	1/13	5	4,55	11
60	1	0,950	1	7,5	7,84	—
50	4	3,8	1/4	7,5	7,77	1
20	1	0,950	1	10	9,10	—
40	13	12,5	1/13	10	7,91	13
70	4	3,8	1/4	10	9,30	2

Drummond und Morton (l. c. 116) bestimmen neben der direkten Absorption auch die der Blauverbindung. Dieser letztere Wert ergibt nicht nur Übereinstimmung mit dem Lovibond-Wert, sondern auch mit den nach anderen Verfahren ermittelten (Edisbury **118)**) (Tabelle 18).

Morton **119)** sieht in dem Zusatz von 7-Methylindol zur Vitaminlösung eine Verbesserung der Absorptionsmessung, da dadurch die einzelnen Banden sich nicht gegenseitig überschatten. Die Reaktion zwischen Vitamin A und Antimonchlorid wird gehemmt. Die Bande bei 610 mμ verschwindet, während die 572 mμ-Bande bestehen bleibt (Emmerie, l. c. 110). Gleichzeitig ändert sich die Farbe von Blau nach Purpur **120)**.

Die internationale Vitaminkonferenz des Völkerbundes hat 1934 in London einen spektrophotometrischen Test auf Vitamin A, der auf Messung der Absorption bei 328 mμ beruht, als Methode zur Bestimmung der A-Aktivität

115) Duliere c. s., J. Soc. Chem. Ind. 40, 316 (1930).
116) Morton c. s., Biochemic. J. 24, 136 (1930); 23, 786 (1929); 22, 987 (1928).
117) Chevallier c. s., Biochemic. J. 27, 299 (1933).
118) Edisbury, Biochemic. J. 26, 1164 (1932).
119) Morton, Biochemic. J. 26, 1197 (1932).
120) Lancet vom 7. Juli 1934.

Tabelle 18. (Nach Drummond-Morton.) Comparison of biological and physical measurements of the relative vitamin A value of the six cod-liver oils

Oil	Biological method	Colorimetric method		Ultra-violet band
		Tintometer	Spectrometer	
C	2	2,5	2,65	2,65
F	5	3,3	3,3	3,25
G	>2	3,0	3,15	3,25
J	2	1,7	1,7	1,5
K	1,5	1,8	1,77	1,7
L	1	1,0	1,0	1,0

anerkannt. Die Konferenz wird eine Tabelle herausgeben, aus der man aus der Absorption die biologische Wertigkeit ablesen kann.

Barnett 120a) hat neuerdings eine Methode beschrieben, die es gestattet, in Butter Carotin spektrometrisch zu bestimmen.

VI. Der Vitamin A-Standard

Die 1931 in London tagende, vom Völkerbund einberufene Vitaminkonferenz hat ein nach einer bestimmten Methode hergestelltes Carotinpräparat (FP = 179° Willstätter) als internationalen Standard für das Vitamin A angenommen.

Die Wirkung eines γ dieses Carotins ist eine internationale Einheit. Das Präparat ist in zugeschmolzenen Flaschen vom Reichsgesundheitsamt zu beziehen.

Die festgelegte internationale Einheit entspricht etwa $^1/_3$—$^1/_5$ der US-Pharmakopoe-Sherman-Einheit.

1 USP-Einheit ist 1 Blaueinheit.
1 USP-Einheit wird zugeführt mit 3—5 γ Carotin.
1 Blaueinheit entspricht also etwa 3 γ Carotin.

Beim Vitamin A liegen die Verhältnisse etwas schwieriger, da es noch nicht in reiner Form vorliegt. Man kann lediglich schätzen, daß 1 USP-Einheit etwa 0,3—0,5 γ Vitamin A entsprechen werden und daß diese Menge etwa 2 Blaueinheiten gibt.

Auf der zweiten internationalen Vitaminkonferenz 1934 in London wurde statt des unreinen Carotin reines β-Carotin von Smp. 184°, optisch inaktiv, als A-Standard eingeführt. β-Carotin ist wirksamer als der alte Standard. Schon 0,6 γ des reinen β-Carotins haben dieselbe Wirkung wie 1 γ des alten Standards. Diese Menge des β-Carotins wird als Einheit festgelegt. Als Lösungsmittel wird Cocosnußöl empfohlen.

120a) Barnett, J. of biol. Chem. 105, 265 (1934).

VII. Die Bildung von Vitamin A und Carotin

Höhere Tiere sind zur Vitamin A-Synthese nicht befähigt. Sie können nur das ihnen zugeführte Carotin in Vitamin A umwandeln. Die Carotinsynthese ist der Pflanze vorbehalten. Sie erfolgt schnell bei Anwesenheit von Licht und Chlorophyll. Die A-Wirksamkeit des Pflanzenmaterials ist während des größten Wachstums am größten und nimmt bis zur Blüte dauernd zu (Virtanen **120 b**)). Die Frage der A-Synthese durch Bakterien ist nicht völlig geklärt. Es scheint, daß Bakterien nur Carotin bilden können, es aber nicht in Vitamin A umlagern (Baumann und Mitarbeiter **121**)). Für das Vitamin A des Lebertrans ist die Bildung durch Diatomeen und Algen erwiesen.

VIII. Die Speicherung des Vitamins A

Die Beobachtung, daß Tiere, die vorher mit einer A-reichen Kost gefüttert wurden, nur sehr schwer A-Vitaminmangelsymptome zeigen, beruht auf der Speicherungsfähigkeit des Organismus für Vitamin A. Die Speicherung erreicht namentlich bei älteren Tieren hohe Grade. Schon eine einmalige Dosis kann Ratten gegen den A-Mangel außerordentlich resistent machen. Weibliche Individuen speichern größere A-Mengen als männliche. Die Unterschiede sind durch die Fettdepots bedingt. Die Speicherung in der Rattenleber kann solche Grade erreichen, daß der Bedarf des Tieres für mehr als ein Jahrhundert gedeckt erscheint.

Die wichtigsten Speicherstätten sind Leber und Fettgewebe. Katzen speichern in der Leber kein Vitamin A, sondern einen Farbstoff, dessen Natur und biologische Rolle umstritten ist.

Nach Zufuhr des Provitamins A, des Carotins, wird Vitamin A in der Leber abgelagert. Erst nach sehr hohen Dosen Carotin erscheint das Provitamin selbst in der Leber. Mineralöle wirken der Resorption des Vitamins A entgegen. Carotin ist nur in Gegenwart von Fett resorbierbar.

IX. Der Vitamin A-Bedarf

Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Huhn und Hund sind auf die Zufuhr des Vitamins A angewiesen. Tauben kommen ohne A-Zulage aus. Der Bedarf des erwachsenen Menschen beträgt etwa 500 USP.-Einheiten pro Tag. Die erwünschte Zufuhr liegt aber viel höher.

X. Vorkommen des Vitamins A [122])

Als Einheit gilt in folgender Tabelle diejenige Wirkung, die bei A-frei ernährten, im Gewichtsstillstand befindlichen Ratten im 4—8 wöchentlichen Versuch eine Gewichtszunahme von 3 g pro Woche hervorruft.

120b) Virtanen c. s., Biochem. Z. 267, 179 (1933).
121) Baumann c. s., J. of biol. Chem. 103, 350 (1933).
122) Scheunert, Die Vitamine. Handbuch der Lebensmittelchemie 1933. — Debré, C. r. Soc. Biol. Paris 114, 1162 (1933).

Tabelle 19

Substanz	Vitamin A-Einheiten pro g	Substanz	Vitamin A-Einheiten pro g
Lebertran	10—500	Gelbe Teile vom Kürbis, Grüne getrocknete Erbsen	4—10
Butter	30— 50	Lattich, Erbsenschoten, Bohnenschoten, Sellerieblätter, Bananen, Tomaten	1—10
Eigelb	10— 50	Gelbe Rüben (turnips), weiße Futterrüben, Linsen, Gerste, Kleie, Brot, Äpfel, Orangensaft	unter 1 aber nachweisbar
Ei, gesamt	15— 20	Radieschen, Pilze, Reis unpoliert u. poliert, Hirse, Mehle, Weizen, Hafer, Stärke, patent flour, pflanzliche Öle wie Arachisöl, Cocosnußöl, Leinsamenöl, Olivenöl, Rapsöl, Sesamöl	Spur—0
Milch	2		
Kondensmilch	4		
Vollmilchtrockenpulver	16		
Fleisch (Rind, Schwein, Hammel, Huhn, Ratte)	Spur—0,5		
Blut	1— 2		
Niere	8— 10		
Lunge	10— 15		
Leber	5—140		
(In den Sommermonaten ist die Leber A-reicher als im Winter)			
Spinat	25— 60		
Karotten	25— 70		
Klee, Alfalfa	25— 60		
Alfalfa, trocken	100		
Salat, grün	50		
Brunnenkresse	50		
Orangenschalenöl	bis 50		
Maisöl (gelb)	10		
Gelber Mais	3— 4		

Tierische Produkte enthalten zur Hauptsache reines Vitamin A. Die A-Wirksamkeit der Butter ist nur zu 15% auf den Carotingehalt zurückzuführen. Pflanzliche Nahrungsmittel dagegen enthalten fast nur Carotin. Der A-Gehalt der Pflanzen geht im allgemeinen der grünen Farbe parallel. Stark rot pigmentierte Gemüse und Früchte, wie Tomaten und Karotten, sind stark A-wirksam. Eine getrennte Bestimmung des Carotin und Vitamin A-Gehaltes ist im Tierversuch unmöglich.

Angaben über die Verteilung des Vitamins A im Organismus finden sich bei Debré, v. Euler, Moore u. a.

XI. Chemische Natur des Vitamins und der Provitamine A [123]

Carotin ist ein Gemisch dreier Isomerer, des α-, β- und γ-Carotins, die sämtlich in kleinsten Dosen starke Vitamin A-Wirkung besitzen. Sie werden im Organismus durch ein Ferment, die Carotinase, in Vitamin A umgewandelt. (Nach Drummond zweifelhaft, Ber. Physiol. 69, 499.) Die Umlagerung kann auch in vitro durch Bebrütung kolloidaler Carotinlösungen mit Leberbrei oder Serum bewerkstelligt werden.

Carotin besteht aus einer Kette von Isoprenresten, deren Enden von zwei Iononresten besetzt sind. α-Carotin ist aus dem symmetrischen β-Carotin durch Verschiebung der Doppelbindung innerhalb eines Ringes entstanden zu denken.

123) Siehe Arbeiten von R. Kuhn c. s. und P. Karrer c. s. in Ber. Chem. Ges., Z. physiol. Chem. und Helvet. chim. Acta 1930—34. Zusammenfassung bis 1932 bei Karrer, Handbuch der Biochemie, Erg.-Werk, Bd. 1. Jena 1933. Neueste Zusammenfassung bei Zechmeister, Carotinoide, 1934.

```
CH3 CH3
  \ /
   C            CH3              CH3
  / \            |                |
CH2  C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=
 |   ||                                              CH3 CH3
CH2  C·CH3                                             \ /
  \ /                CH3              CH3               C
  CH2                 |                |               / \
         =CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C   CH2
                                                ||   |
                 β-Carotin.             H3C·C   CH2
                                                  \ /
                                                  CH2
```

Vitamin A entsteht durch Spaltung des Carotinmoleküls in zwei gleiche Hälften, ein Vorgang, der nur bei β-Carotin möglich ist, während die anderen Isomeren nur je 1 Molekül Vitamin liefern. Dadurch erklärt sich die doppelt so starke Vitamin A-Wirkung des β-Carotins.

```
CH3 CH3
  \ /
   C            CH3              CH3
  / \            |                |
CH2  C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH2OH
 |   ||
CH2  C·CH3              Vitamin A.
  \ /
  CH2
```

XII. Eigenschaften des Vitamins A und des Carotins

Tabelle 20

	Vitamin A	Carotin
Aussehen	Farbloses Öl	Rot-violette Kristalle, in konzentrierter Lösung rot, in verdünnter gelb
Vorkommen	Namentlich in tierischen Nahrungsmitteln	Namentlich in pflanzlichen Produkten
Löslichkeit	Löslich in allen Lipoidlösungsmitteln	Dasselbe
Temperaturbeständigkeit	Erheblich, Butter verliert bei 17stündiger Erhitzung in N_2-Atmosphäre 33 % der Wirkung	Erheblich, Tomatensaft verliert erst nach 17 Stunden Erhitzung auf 97° in N_2-Atmosphäre 17 % der Wirkung
Sauerstoffempfindlichkeit	Sehr empfindlich! 12stündige Durchlüftung von Butter bei 80° zerstört	
Beständigkeit gegen Kochen und Pasteurisieren	In Konserven voll erhalten, in Milch durch Kochen nicht zerstört	Dasselbe

	Vitamin A	Carotin
Beständigkeit gegen Trocknung	Bei der Milchtrocknung können Verluste entstehen (Zerstäubungsverfahren)	Im Heu ist die Wirksamsamkeit z. T. verloren, schnelle Trocknung von Früchten zerstört nicht
UV.-Betrahlung	Zerstört	Dasselbe
Härtung von Ölen	Unter milden Bedingungen erhalten	
Zerstörende chemische Agenzien	P_2O_5, Acetylchlorid, alkalische Kupferlösung, H_2O_2, Natriumbisulfit	
Besondere Eigenschaften	Wird durch feinverteilte Stoffe wie Särke zerstört Wird vernichtet durch Öle, die Linolsäure enthalten oder peroxydhaltig sind	Wird nur resorbiert, wenn die Diät fetthaltig ist
Geeignetes Lösungsmittel für den Tierversuch	Sesamöl, Erdnußöl, gehärtete Öle	Dasselbe
Verseifung	Erhalten	Dasselbe
Säurebeständigkeit	Gering	
Oxydationsschutz	Hydrochinonzusatz, aufbewahren in braunen Flaschen	

XIII. Darstellung Vitamin A-haltiger Konzentrate für den Tierversuch

Für viele Testversuche und für die Carr-Price-Reaktion ist es nötig, das nur in kleinen Konzentrationen vorkommende Vitamin A anzureichern. Bewährte Methoden sind folgende:

Gewinnung des Unverseifbaren aus Lebertran

A. Methode von Takahashi-Kawakami 124). Zu einer frisch bereiteten noch warmen Lösung von 40 g KOH in Alkohol gibt man 100 g Lebertran und erhitzt 30 Minuten auf dem Wasserbad. Die Lösung wird nach dem Abkühlen mit 200 ccm Wasser verdünnt und mit 150 ccm Petroläther extrahiert (Sdp. 30—50°). Die Extraktion wird dreimal wiederholt. Die vereinigten Petrolätherextrakte werden mit Wasser geschüttelt, bis keine Tendenz zur Emulsionsbildung besteht, und das Lösungsmittel dann im Vakuum unter CO_2 verjagt.

Der verbleibende Rest enthält nahezu quantitativ die Vitamine A und D und wird nun entweder für die Carr-Price-Reaktion in Chloroform oder für den biologischen Testversuch in Öl aufgenommen. (Vorsicht bei der Wahl des Öls, s. unten.)

B. Methode nach Marcus 125). 1. Zu einer frisch bereiteten Lösung von 260 g NaOH in 250 ccm Wasser gibt man 1000 ccm Lebertran und verrührt die Masse nach Zugabe von 10 ccm Alkohol gut. Die Seife wird unter starker Erwärmung steif. Man läßt die Masse abkühlen, gibt 90 ccm Wasser hinzu und zieht die Lösung wiederholt mit Äthylendichlorid aus. Dieses Lösungsmittel ist vorteilhafter als Äther oder Petroläther, da es erstens für das Vitamin A ein besseres Lösungsmittel

124) Takahashi c. s., J. chem. Soc. Jap. 44, 590 (1923).
125) Marcus, J. of biol. Chem. 80, 11 (1928).

ist, und da es zweitens schwerer ist als die Seifenlösung und so unten abgezogen werden kann, wobei die Seifenlösung bei mehreren aufeinanderfolgenden Extraktionen stets im Scheidetrichter bleiben kann. Die vereinigten Äthylendichloridlösungen werden anschließend mit wasserfreiem Chlorcalcium behandelt, das außer Wasser noch kleine Mengen Seife entfernt. Die trockenen Lösungen werden im Vakuum so weit eingeengt, daß als Rückstand ein gelboranges Öl verbleibt, das die ganze Wirksamkeit an A- und D-Vitamin des Ausgangsmaterials besitzt. Sämtliche Operationen sind unter Luftabschluß auszuführen.

C. Methode nach Marcus. 2. Zu einer Lösung von 250 g NaOH in 480 ccm Alkohol gibt man 100 ccm Wasser und 1000 ccm Lebertran und erhitzt 40 Minuten bei 60°. Der Alkohol wird durch Vakuumdestillation entfernt. Die Seife verdünnt man mit 300 ccm Wasser und zieht wie unter B die Vitamine durch Extraktion mit Dichloräthylen aus. Der nach Verjagen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird dann mit Öl oder Chloroform aufgenommen.

Auch Weidemann **126)** gibt eine Methode zur Verseifung der Öle und Fette an, die auf Verseifung mit alkoholischer Kalilauge beruht. Nach dem Verseifen wird die Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Calciumchlorid gefällt, wobei nach der Gleichung: $2\,KOH + CaCl_2 = 2\,KCl + Ca(OH)_2$ ein fast neutrales Filtrat entsteht.

XIV. Darstellung der Carotine

Die Darstellung geschieht am besten aus Karotten, Brennesseln oder Rüben. Willstätter und Mieg 127), Willstätter und Stoll 128) stellen Carotin aus Brennesseln dar. Diese Methoden bilden die Grundlagen der seither ausgearbeiteten Verfahren.

A. Darstellung von Carotin aus Karotten 128a), 129), 130), 131)

32 kg frische Karotten werden in Scheiben von 4 mm Dicke geschnitten und 2mal mit Wasser bei 50—60° je 2 Stunden extrahiert. Die Karotten werden darauf im Heißluftstrom bei 50—60° 22 Stunden lang getrocknet. Die Masse wird fein gepulvert. Ausbeute: 1,67 kg. — Das Pulver wird mit 1,75 Liter Petroläther (unter 55°) 1 Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt, abfiltriert und die Rückstände mit Petroläther gewaschen, bis die Lösung farblos abläuft (5mal je 500 ccm). — Die vereinigten Extrakte werden filtriert und im Vakuum auf 300 ccm eingeengt (Temperatur nie über 35°!). Die noch heiße Lösung wird zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen und das Filtrat im Eisschrank der Kristallisation überlassen. — Die Kristalle werden 3mal mit je 30 ccm Petroläther gewaschen und in 30 ccm Chloroform gelöst. Die Lösung wird durch Asbest filtriert in einer Kristallisationsschale mit 10 ccm Alkohol versetzt. Die Schale wird über eine zweite mit Alkohol gefüllte gestellt (Exsikkator) und der Kristallisation im Vakuum überlassen. Ausbeute: 1,4 g Carotin.

B. Darstellung von Carotin aus Blättern

Spinat oder Rübenblätter werden 22 Stunden lang bei 50—60° getrocknet, 1,5 kg Trockensubstanz werden mit 2—2,5 Liter Petroläther 16 Stunden lang bei Zimmertemperatur geschüttelt (Petroläther Siedepunkt 40—70°). Das Lösungs-

126) Weidemann, Biochemic. J. 20, 685 (1926).
127) Willstätter c. s., Ann. Chem. 355, 12 (1907).
128) Willstätter c. s., Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913.
128a) Smith, J. of biol. Chem. 96, 35 (1932).
129) Escher, Z. physiol. Chem. 64, 47 (1910).
130) Kohl, Diss., Leipzig 1912.
131) Schertz, J. agricult. Res. 30, 471 (1925).

mittel wird abfiltriert, die Rückstände wie oben gewaschen. Die Petrolätherlösungen werden mit einer Lösung von 30 g KOH in 200 ccm Methylalkohol geschüttelt und anschließend mit 500 ccm Wasser je 4mal gewaschen. Die Petrolätherlösung wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum auf 100—200 ccm eingeengt. Man versetzt sie mit dem 2—3fachen Volumen absolutem Alkohol. Ausfallende Fette und Wachse werden entfernt, das Filtrat im Eisschrank der Kristallisation überlassen. Die Kristalle sind mit Fett verunreinigt. Man kocht sie mit 25 ccm Petroläther aus und filtriert die Lösung, wobei das Carotin auf dem Filter bleibt. Umkristallisieren aus Chloroform.

Die Trennung der einzelnen Isomeren ist in den Arbeiten von Kuhn und Mitarbeitern nachzulesen. Die Darstellung kann natürlich auch aus anderen Materialien wie Nebennieren (Bailly-Netter **132)**), Corpora lutea, Paprikaschoten oder Vogelbeeren geschehen (Escher, l. c. 129), Fischer-Röse **133)**, Kuhn-Lederer **134)**). Auch neuere Darstellungsmethoden wurden beschrieben (Deleano **135)**, Vermasse **136)**) (vgl. Strain **136a)**).

XV. Kolorimetrische Carotinbestimmung

Carotin wird am besten direkt kolorimetrisch bestimmt. Man vergleicht die Farbe gegen eine standardisierte Bichromatlösung, die gegen Carotin geeicht wurde. Der direkte Vergleich der Farbe der Butter gibt zu hohe Werte. Am besten wird eine Petrolätherlösung des Unverseifbaren benutzt. Methoden zur Carotinbestimmung wurden besonders von Chidester **137)**, Palmer **138)** u. a. ausgearbeitet. Sie beruhen alle auf dem Willstätterschen Prinzip. Neuerdings führen Kuhn und Mitarbeiter **139a)** das Azobenzol als Vergleichslösung ein. Eine Carotinlösung in Benzin (Siedepunkt 70—80°) wird gegen eine Lösung von 14,5 mg reinstem Azobenzol in 100 ccm 95%igem Alkohol gemessen (Mikro-Hellige-Kolorimeter).

Bei der kolorimetrischen Carotinbestimmung stören andere anwesende Carotinoide erheblich. Deshalb wird in den meisten Fällen eine Trennung unumgänglich sein. Man extrahiert zu diesem Zweck das trockene Material mit Methanol, dann mit Benzin und vereinigt beide Lösungen. Man entmischt mit Wasser. Die Benzinphase wird mit 90%igem Methanol und dieses wieder mit Benzin ausgeschüttelt. Die Benzinlösung enthält Carotin, Lycopin, Lutein- und Zeaxanthinester. Die Methanolphase Lutein, freies Zeaxanthin und Crocetin. Die Benzinlösung wird mit demselben Volumen alkoholischer Kalilauge (5 g KOH auf 100 ccm 96%igem Alkohol) 3 Stunden bei 40° behandelt. Man entmischt durch Wasserzusatz (Alkoholphase muß 20 % Wasser enthalten), trennt die Schichten und schüttelt nochmals mit Benzin aus. Die Benzinlösung wird mit 90%igem Methanol gewaschen. Sie enthält Carotin und Lykopin. Eine Trennung beider erreicht man durch die Adsorptionsmethode von Tswett **139)**. Ein gerades Chlorcalciumrohr wird mit einer Mischung aus 10 Teilen Fasertonerde (Merck) und 40 Teilen Aluminiumhydroxyd (grob, Merck) gefüllt. Man saugt an der Wasserstrahlpumpe die Benzinlösung hindurch. Dabei erscheint Carotin im Filtrat, während Lycopin die Schicht

132) Baily c. s., Bull. Soc. Chim. biol. Paris 14, 623 (1932).
133) Fischer c. s., Z. physiol. Chem. 88, 331 (1913).
134) Kuhn c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 1349 (1931).
135) Deleano, Biochem. Z. 259, 110 (1933).
136) Vermasse, Diss., Utrecht 1931.
136a) Strain, J. of biol. Chem. 105, 523 (1934).
137) Chidester, Thesis Rudgers Univers. 1932.
138) Palmer, Carotinoids and related Pigments. New York 1922.
139a) Kuhn c. s., Z. physiol. Chem. 206, 41 (1932).
139) Tswett, Botan. Ber. 24 (1906); 29, 630 (1911).

langsamer als leuchtend roter Ring durchwandert. Eine Trennung kann auf dieselbe Weise durch scharf getrocknetes, gefälltes Calciumcarbonat erreicht werden.

Selbstverständlich kann die Carotinbestimmung auch spektrophotometrisch erfolgen **140)**.

1. Die Carotinbestimmung im Blut 141), 142). Carotin ist ein normaler Bestandteil des Blutes **143)**, Carotinämie wird häufig nach Genuß von Gemüse und bei Diabetes beobachtet. Carotin ist aus Blut nicht ohne weiteres durch Petroläther extrahierbar, da es z. T. an Eiweiß gebunden vorkommt. Es ist nötig, vor der Extraktion das Eiweiß durch Alkohol zu koagulieren. Methoden zur Carotinbestimmung im Blut wurden vor allem von Willstätter und van den Berg beschrieben. Sie beruhen auf der Kolorimetrie gegen Bichromat. Die Werte van den Bergs sind nach Connor (l. c. 141) zu hoch, da der Standard zu hoch eingestellt war. Während van den Berg im Serum 0,4—1,34 mg % Carotin fand, liegen die Werte gewöhnlich bei 0,02—0,11 mg%. Folgende Methode wird von Connor angegeben:

3 ccm Plasma werden mit 3 ccm absolutem Alkohol geschüttelt, zentrifugiert und der Alkohol verworfen. Der Niederschlag wird mit 4 ccm Petroläther geschüttelt, zentrifugiert und die Petrolätherlösung kolorimetriert. Als Vergleich dient eine Kaliumbichromatlösung, die 0,04- oder 0,02%ig ist. Die erstere entspricht einer Carotinkonzentration von 0,0003%, die zweite einer solchen von 0,0001%. Plasma hat einen Carotingehalt von etwa 0,05 mg%.

2. Die Carotinbestimmung in Organen. Untersuchungen über den Carotingehalt verschiedener Organe wurden von Euler **144)**, Wolff **145)**, Moore **146)**, Green **147)**, Fox **148)**, Kauffmann-Drigalski **149)**, Kuhn und Mitarbeiter **150)**, Lönnberg **151)** u. a. mitgeteilt. Am carotinreichsten erwiesen sich die Corpora rubra, die in 0,3 g etwa 0,6 mg Carotin enthalten. Leber hat 1—6 mg%, Nebennieren 4—15 mg% Carotin. Die Bestimmung geschieht nach Connor wie folgt:

Das frische Organ wird gewogen und mit einer Lösung von 20% KOH in 70%igem Alkohol so lange gekocht, bis die Substanz aufgelöst ist. Die Lösung wird dann mit einer genügenden Menge wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und das trockne Pulver wiederholt mit Petroläther extrahiert. Die Petrolätherextrakte werden mit 85%igem Alkohol gewaschen, bis der Alkohol farblos bleibt. Man trocknet wie oben und kolorimetriert gegen Bichromatlösung.

Kuhn und Mitarbeiter empfehlen die Extraktion des Organs mit dem doppelten Volumen Aceton, die im ganzen 3mal wiederholt wird, worauf 2—3mal mit Benzin ausgezogen wird. Die Extrakte werden vereinigt und mit Wasser entmischt. Man wäscht die Benzinphase mehrmals mit 90%igem Alkohol und kolorimetriert.

XVI. Substanzen mit A-Wirkung 152), 153)

Die Carotine wirken auch bei größter Überdosierung nicht toxisch. Sie sind nur in Gegenwart von Fett resorbierbar. Nach Verfütterung der Carotine wird bei β-Carotin doppelt soviel Vitamin A in der Leber abgelagert als nach

140) Shrewsbury, J. of biol. Chem. 101, 701 (1933).
141) Clausen, Trans. amer. pediatr. Soc. Chikago 1931.
142) Mackay, Arch. Dis. Childr. 9, 65 (1934).
143) Connor, J. of biol. Chem. 77, 619 (1928).
144) Euler, Sv. Kem. Tidskr. 44, 191 (1932).
145) Wolff, Lancet 1932, 617.
146) Moore, Lancet 1932, 669.
147) Green, Lancet 1932, 723.
148) Fox, Lancet 1933, 953.
149) Kauffmann c. s., Klin. Wschr. 1933, 306; Diss. Zürich 1931 E.T.H.
150) Kuhn c. s., Z. physiol. Chem. 200, 246 (1931).
151) Lönnberg, Sv. Akad.-Ark. Zool. 21 B (1929); 23 A (1931).
152) Kuhn c. s., Z. physiol. Chem. 221, 129 (1933).
153) Brockmann, Z. angew. Chem. 1934.

α- oder γ-Carotin. Die obengenannten Dosen bringen auch den Dauerröstrus zum Verschwinden. Zur Hervorbringung der 4 maligen Wiederkehr des Genitalzyklus sind etwa 20 γ erforderlich.

Tabelle 21

Substanz	Minimaldosis
Vitamin A	0,3—0,5 γ
α-Carotin	5 γ
β-Carotin	2,5 γ
γ-Carotin	5 γ
Kryptoxanthin	5 γ
β-Oxycarotin	5 γ
β-Semicarotinon	5 γ
β-Semicarotinonmonoxim	5 γ
β-Dehydrosemicarotinon	5 γ
β-Carotinoxyd	5 γ
Carotinjodid	40 γ

Nach neueren Untersuchungen von Kuhn e. s. 154) ist die Wachstumswirkung des gelben Maises durch den Gehalt an Kryptoxanthin bedingt. Der Farbstoff wird im Organismus in Vitamin A verwandelt.

Das Vitamin D 1) 2) 3)

I. Die Avitaminose D

1. Die Symptome des Vitamin D-Mangels

Die typische Vitamin D-Mangelkrankheit ist die Rachitis des wachsenden Organismus. Die Hauptsymptome der Rachitis sind:

1. Skelettveränderungen,
2. Veränderungen im Mineralstoffwechsel und in der Blutzusammensetzung.

Das zeitlich zuerst auftretende Symptom der Skeletterkrankung ist eine Schädelerweichung oder Kraniotabes, die bei später von Rachitis befallenen Kindern im 3.—4. Monat, bei Frühgeborenen noch früher auftritt. Zeitlich folgt darauf meist eine Schwellung sämtlicher Knochen-Knorpelgrenzen der Rippen, die zu dem diagnostisch leicht erkennbaren Rosenkranz führt. Außer Rosenkranz und Kraniotabes sind für die Rachitis typisch die Veränderungen an den Extremitäten. Epiphysenschwellungen durch Quellung der Knorpelwucherungszone sind in ihrem Wesen dem Rosenkranz gleichzustellen. Die rachitischen Veränderungen an den Extremitäten treten am besten bei der histologischen oder bei der Röntgenuntersuchung zutage.

154) Kuhn e. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 593 (1934).
1) Sherman-Smith, Vitamins. New York 1931.
2) Browning, The Vitamins. London 1931.
3) Goldblatt, Erg. Path. 25 (1931).

a) Histologie der normalen und der rachitischen Epiphysengrenze

Zum Verständnis der rachitischen Knochenveränderungen ist die Kenntnis des normalen Knochenwachstums erforderlich. Das Längenwachstum, das bei der Rachitis zur Hauptsache gestört ist, vollzieht sich nur an der Epi-Diaphysengrenze durch endochondrale Verknöcherung.

Beim wachsenden langen Knochen finden wir an der Grenze Diaphyse-Epiphyse die Knorpelzellen zu Reihen angeordnet, indem die Zellachse der Knochenachse parallel verläuft. Die Zellen vergrößern sich, wobei besonders die diaphysenwärts gelegenen sich umbilden. Die aus 2—3 solcher Zellen bestehenden Reihen (Säulen) sind durch zylindrische, bienenwabenähnliche Mäntel von Knorpelsubstanz umgeben. Dieses Knorpelgerüst erstarrt durch die provisorische Verkalkung. Damit beginnt von der Diaphyse her die eigentliche Bildung des Knochens. Gleich bei Beginn der Knochenbildung entwickelt sich ein stark vaskularisierter Kern innerhalb des wachsenden Knorpels. Von diesem geht die fortschreitende Markraumbildung vor sich, in der Weise, daß immer neue Kapillaren aussprossen, die sich mit Markzellen umgeben. Letztere nehmen in der Nähe des neuzubildenden Knochens die charakteristische Osteoblastenanordnung an.

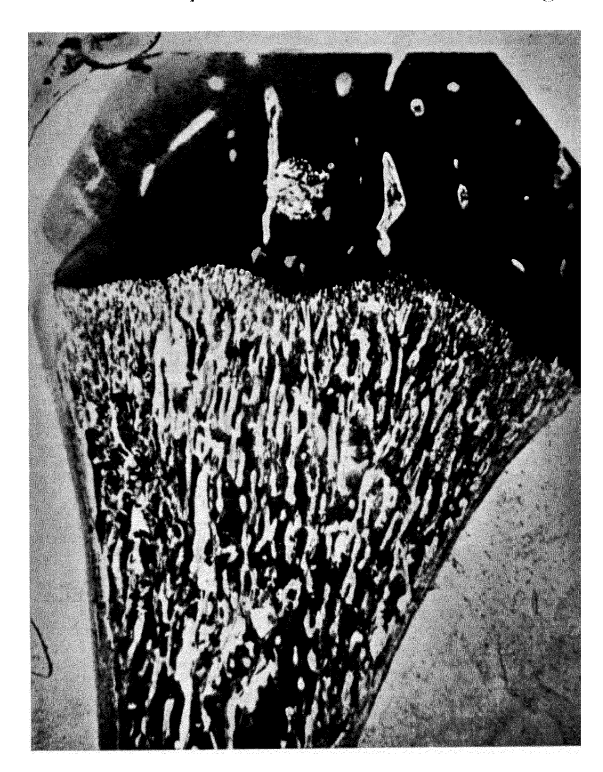


Abb. 22. Normale Epiphysengrenze. (Nach Kihn.)

Den obigen Knorpelzellsäulen kommt nun je ein Markraum entgegen. Dabei verschwinden die Knorpelzellriesen in dem epiphysenwärts vorschreitenden Markraum, der nun als Zapfen in der erstarrten Knorpelwabe drinsitzt. Nun beginnen die Osteoblasten den Hohlzylinder mit osteoider Substanz auszumauern, die bald verknöchert. Währenddessen wird das provisorische Verkalkungsgebiet resorbiert und aus dem wabenartigen Bau der Knorpelknochengrenze entsteht die Gitterstruktur der Knochenspongiosa (Heubner).

Die provisorische, präparatorische Verkalkungszone verläuft beim normalen Knochen in einer geraden Linie. Die darunter befindliche Schicht von Osteoid bildet nur einen schmalen Streifen. Für die Rachitis ist die Störung der provi-

sorischen Verkalkung typisch. Diese erfolgt zunächst nicht an der gesamten Epi-Diaphysengrenze, sondern nur an einigen Stellen, wodurch es zur Ausfransung der sonst sehr scharfen Verkalkungslinie kommt. Mit der Entwicklung der Rachitis verschwindet die provisorische Verkalkungszone, und in dem Gebiet zwischen Diaphyse und dem früheren Verkalkungsraum kommt es zur Bildung großer Mengen unverkalkten Osteoids. Im Längsschnitt sieht man die bekannte Form der becherförmigen Aushöhlung der Epi-Diaphysengrenze.

Bei der Heilung der Rachitis kommt es zu einer schlagartig einsetzenden Einlagerung von Kalksalzen. Die endochondrale Verkalkung verläuft mit Hilfe einer neuen provisorischen Verkalkungszone, die nicht direkt an der Knorpelknochengrenze liegt, sondern mehr nach der Epiphyse zu, wo sie gelegen haben würde, wenn die Rachitis nicht bestanden hätte. Durch weitere Verkalkung des zwischen dieser Schicht und dem Markraum gelegenen Osteoids erfolgt dann völlige Heilung.

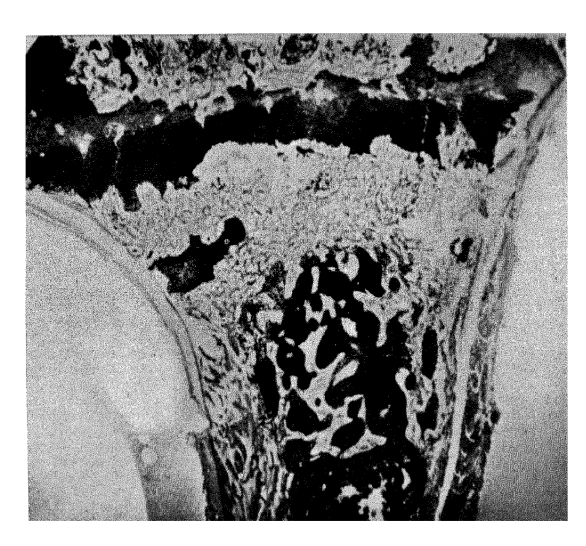


Abb. 23. Das histologische Bild der floriden Rachitis an der Epiphysengrenze. (Nach Kihn.)

b) Der normale und der rachitische Knochen im Röntgenbild 4)

Die oben beschriebenen Veränderungen der Knochen bei der Rachitis treten im Röntgenbild ebenfalls scharf zutage. Am Ende mancher Röhrenknochen ist die Epiphysengrenze ausgefranst und verwaschen und das Diaphysenende becherförmig ausgehöhlt. Die Metaphyse besteht aus Knorpel oder Osteoid und enthält wenig oder gar keinen Kalk. Neben diesem aktiven Typ bleibt das Diaphysenende beim passiven Typ ziemlich normal, flach oder konvex gegen die Epiphyse verlaufend. Der passive Typ kann in den aktiven übergehen.

Bei mäßig schweren Fällen ist das am Epi-Diaphysenende gelegene Band der provisorischen Verkalkungszone unterbrochen oder fehlt ganz. Beim Tier kommt nur der aktive Typ vor.

Bei 4 Wochen alten Ratten auf einer rachitogenen Diät treten schon nach einwöchentlicher Fütterung in den langen Knochen Veränderungen ein, die im Röntgenbild zunächst in einer Vergrößerung der hellen Zone zwischen Diaphyse und Epiphyse bestehen, mit leichter Andeutung einer beginnenden Aushöhlung des Diaphysenendes. Mit Steigerung der Knorpelwucherung wird die rachitische Metaphyse immer größer und die Entfernung von der kalkhaltigen Diaphyse zur Epiphyse, d. h. die helle Zone breiter. Damit nimmt die Aushöhlung der

4) Wimberger, Lancet 2, 11 (1922); Erg. inn. Med. 1925.

Diaphyse zu. Am schwersten sind die Veränderungen distal am Radius und Ulna, proximal an der Tibia und den beiden Enden der Fibula.

Folgende Abbildungen zeigen einen normalen Knochen im Vergleich zu den rachitischen. Wie ersichtlich, ist beim gesunden Knochen die Begrenzung zwischen Epi-Diaphyse eine haarscharfe, abschließende, homogene, dunkle Linie, die im histologischen Präparat der provisorischen Verkalkungszone entspricht. Diaphysenwärts folgt eine hellere ganz schmale Querzone.

Bei der Heilung der Rachitis treten die bekannten Veränderungen ebenfalls im Röntgenbild auf. Zunächst erscheint als erstes Zeichen der Heilung das schmale etwas unregelmäßige Band der provisorischen Verkalkungszone zwischen Epi- und Diaphyse in der verdickten Knorpelwucherungszone, in

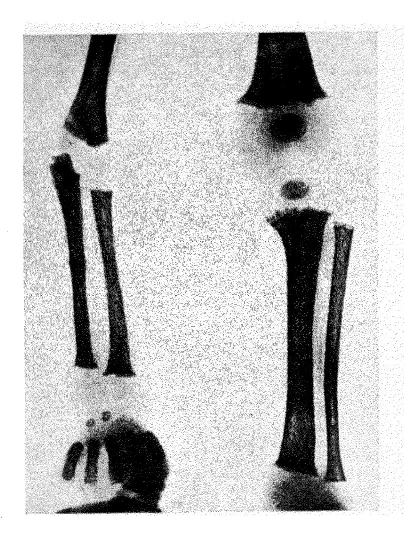


Abb. 24. Schwere floride Rachitis im Röntgenbild. (Nach Wimberger.)

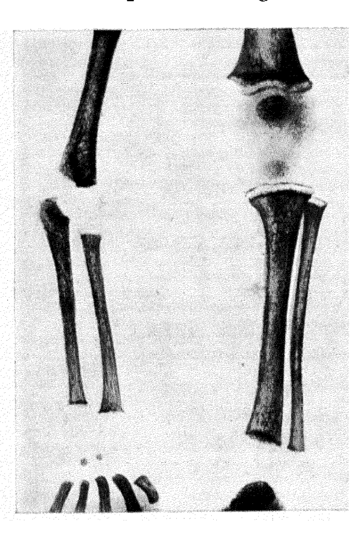


Abb. 25. Beginn der Heilung einer Rachitis im Röntgenbild. Neue präparatorische Verkalkungszone über den Diaphysenenden als Schattenlinien sichtbar. (Nach Wimberger.)

einem gewissen Abstand von der Diaphyse. Zwischen dieser Verkalkungslinie und der kalkhaltigen Diaphyse liegt ein heller kalkfreier Saum, der um so breiter ist, je länger der rachitische Prozeß dauerte. Die weitere Heilung führt schnell zu einer Verschmelzung der Verkalkungslinie mit der Diaphyse. Die Verkalkungszone ist wieder gegen die Diaphyse scharf abgegrenzt. Auch in der Diaphyse kommt es zu verstärkter Kalkeinlagerung. Die ganze Begrenzung des Knochens wird scharf. Die Epi-Diaphysenenden zeigen eine viel kompaktere Struktur gegen die übrige Diaphyse als normal, woran man noch nach langer Zeit eine abgeheilte Rachitis erkennen kann.

Bei der Ratte erscheint die Heilung sehr früh im Röntgenbild. Bereits in der ersten Woche findet man in der hellen Zone zwischen Epi- und Diaphyse das schmale Band der präparatorischen Verkalkungszone. Diese verbreitert sich allmählich, und wenn die ganze Metaphyse verkalkt ist, bleibt nur noch eine sehr schmale Linie, die Epi- und Diaphyse scheidet.

c) Weitere Erscheinungen des Vitamin D-Mangels

Spasmophilie: Die Erscheinung, daß rachitische Kinder namentlich im Frühjahr elektrische Übererregbarkeit und Krämpfe zeigen, beruht auf einer Heilkrisis der Rachitis (Rominger-Meyer-Bomskov 5)). Der Mineralstoffwechsel der Tetanie ist das Positiv der rachitischen Stoffwechselstörungen. Typische Tetanie läßt sich bei rachitogen ernährten Ratten auslösen durch plötzliche Änderung der phosphorarmen Kost in eine phosphorreiche (Shohl, l. c. 3).

Osteomalacie: Zwischen Rachitis und Osteomalacie bestehen nur altersbedingte Unterschiede. Die Osteomalacie ist die Rachitis des Erwachsenen.

Wachstumsstillstand: D-arm ernährte Ratten zeigen nach längerer Versuchsdauer Wachstumsstillstand. Zugabe des fehlenden Vitamins führt Gewichtszunahme herbei.

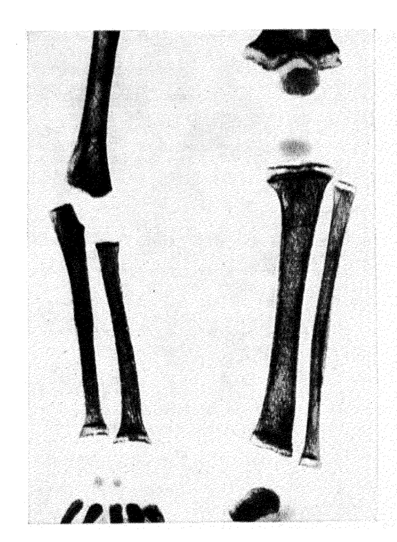


Abb. 26. Im Röntgenbild sichtbare Reparation einer Rachitis an allen Metaphysen. (Nach Wimberger.)

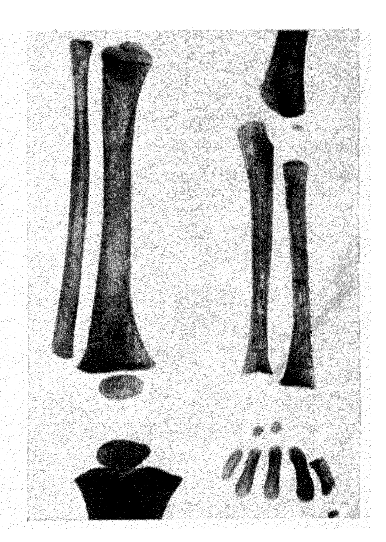


Abb. 27. Geheilte Rachitis im Röntgenbild. (Nach Wimberger.)

Resistenzverminderung: Im Verlauf der D-Avitaminose tritt eine Herabsetzung der natürlichen Resistenz ein, die zu Infekten aller Art führt.

Stoffwechselstörung: Die hauptsächlichste Störung im Mineralhaushalt bei der Avitaminose D liegt im Phosphorstoffwechsel. Schon vor Beginn der klinischen Erscheinungen der Rachitis ist eine starke Ausschwemmung von Phosphaten, namentlich im Urin, nachweisbar. Die Stoffwechselstörung der floriden und heilenden Rachitis läßt sich in vier Stadien einteilen (Rominger-Meyer-Bomskov). Mit Beginn der dritten Phase zeigt sich als erstes Symptom der Heilung eine abnorm starke Phosphatretention, die so regelmäßig auftritt, daß man an Hand dieser Reaktion Vitamin D-haltige Präparate auswertet. Die schwere Mineralhaushaltstörung findet besonders ihren Ausdruck in der fehlerhaften Zusammensetzung des Knochens. Während die

---

5) Rominger-Meyer-Bomskov, Z. exper. Med. 73 und 78.

Aschenmenge des Knochens bei gesunden Ratten im Alter von 23 Tagen 40 % beträgt und nach 3 Wochen auf 62 % ansteigt, weisen 6 Wochen alte rachitische Tiere nur einen Wert von 26 % auf (Dutcher). Auch der Kalk- und Phosphatgehalt des Knochens weicht stark von der Norm ab. Der Knochenkalkgehalt sinkt nach mehrwöchentlicher Fütterung mit rachitogener Kost von etwa 20 % auf etwa 15 % (auf fettfreie Trockensubstanz berechnet). Das Verhalten der Knochenasche geht am besten aus folgender Abb. 28 hervor.

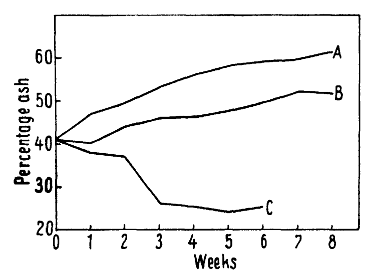


Abb. 28. Knochenasche im Prozent des getrockneten extrahierten Femurs bei Ratten mit zunehmendem Alter.

A auf vollwertiger, B auf der rachitogenen Kost 2965 mit Vitamin D-Zulage, C auf derselben Diät ohne D-Zufuhr. (Nach Dutcher 6).)

2. Die experimentelle Rachitis der Ratte

Obwohl Spontanrachitis auch bei Ratten vorkommt, gelang die einwandfreie Erzeugung dieser Krankheit erst den Amerikanern McCollum, Sherman und Pappenheimer (l. c. 1—3).

Setzt man junge Ratten auf eine rachitogene Diät, so entwickeln sie nach 2—3 Wochen das typische Bild der Rachitis des Kindesalters. Rein äußerlich ist schon eine schwere Rachitis bei der Ratte an der Verdickung der Epiphysen sichtbar. Legt man das Tier auf den Rücken, so sieht man in vielen Fällen schon den rachitischen Rosenkranz. Bei leichter Rachitis zeigen die Tiere in ihrem Benehmen keine weiteren Sonderheiten. Bei schwerer Rachitis verlieren sie jedoch ihre natürliche Lebhaftigkeit, sitzen meist zusammengekauert im Hintergrund des Käfigs und zeigen öfter eine skolioseartige Einknickung der Wirbelsäule (Abb. 29). Der Gang auf ebener Fläche wird schwerfällig, mit schräg vom Leib abgesetzten Beinen. Vielfach bewegen sich die Tiere auch auf dem gesamten Tarsus oder Metatarsus fort.



Abb. 29. Skolioseartige Einknickung der Wirbelsäule bei experimenteller Rattenrachitis. (Nach Funk 7).)

Die Diagnose Rachitis kann stets aus dem Röntgenbild oder aber aus histologischen Befunden oder aus Blutphosphorwert und Knochenanalyse gestellt werden. Namentlich das Röntgenbild ist ein wertvolles Hilfsmittel, den rachitischen Prozeß in allen seinen Phasen am selben Tier zu verfolgen.

Histologisch ist die experimentelle Rachitis der Ratte von der Spontanrachitis des Kindes verschieden. Man erhält aber bei abwechselnder Verfütterung einer phosphorarmen rachitogenen Kost mit einer normalen Bilder, die histologisch von echter Rachitis nicht zu unterscheiden sind.

---

6) Dutcher-Creighton-Rothrock, J. of biol. Chem. 70, 173 (1929).
7) Funk, Die Vitamine.

3. Experimentelle Rachitis bei anderen Tieren

Beard und Pomerence 8) konnten durch Verfütterung der Steenbock-Diät 2965 oder der Osborne-Mendel-Park-Kost bei Mäusen Rachitis erzeugen, die nach 14 Tagen mäßig oder schwer war. Sie heilt nach einiger Zeit spontan infolge Wachstumsstillstand ab. Bei Schweinen entsteht auf rachitogenen Diäten schwere Rachitis, die histologisch der menschlichen nahekommt. Auch Kaninchen zeigen auf der McCollum-Kost 3143 schwere rachitische Veränderungen (Goldblatt, l. c. 3). Die Rachitis der Kücken (leg weakness) ist histologisch nicht typisch, weil schon normalerweise der Ossifikationsvorgang beim Vogel ein anderer ist. Stoffwechselchemisch ist sie für die Auswertung des Vitamins D brauchbar.

II. Die Hypervitaminose D

1. Die Erscheinungen der Hypervitaminose D (vgl. l. c. 3)

Überdosierung von Vitamin D in Form von Vigantol oder Lebertran führt zu einem typischen Krankheitsbild, das eine echte Hypervitaminose darstellt. Rein äußerlich zeigen die mit Vitamin D vergifteten Tiere ein struppiges Fell, Mangel an Freßlust, Durchfall und Gewichtsverlust. Bei der histologischen Untersuchung findet man in zahlreichen inneren Organen wie Lunge, Herz, Niere, Leber sowie in den Arterien ausgedehnte Kalkablagerungen im Sinne einer metastatischen Verkalkung. Die Ablagerungen sind bei kalkreicher Nahrung sehr viel ausgeprägter. Bei ungenügender Kalkzufuhr tritt Entkalkung des Knochens auf (Osteoporose). Herbivoren zeigen Hyperphosphatämie, Omnivoren Hypercalcämie. Die Organveränderungen sind teilweise rückbildungsfähig, doch führt die Vergiftung in den meisten Fällen zum Tode (Kreislaufstörungen). Rachitische Tiere sind gegen die Überdosierung außerordentlich resistent.

2. Die toxische Dosis

Die Vitamin D-Präparate variieren in ihrer Giftigkeit stark. Bei der UV.-Bestrahlung des Ergosterins entstehen Substanzen, die antirachitisch nicht wirksam, aber stark toxisch sind und deren Bildung von der Bestrahlungsdauer, vom Lösungsmittel, von der Lichtquelle u. a. abhängig ist. Zur Ermittlung der toxischen Dosis prüft man die Verträglichkeit der Substanz an der Maus. Gleichzeitig wird an der Ratte die antirachitische Grenzdosis festgelegt. Aus beiden errechnet man den therapeutischen Index. Er beträgt für Bestrahlungsprodukte des Ergosterins etwa 1 : 2000 bis 1 : 5000. Für reines D-Vitamin wurde der Wert zu 1 : 3500 ermittelt. Ältere Angaben über die Ungiftigkeit selbst der 10000—40000fachen antirachitischen Grenzdosis sind widerlegt.

3. Die Bestimmung des toxischen Wertes eines Vitamin D-Präparates 9)

Die Bestimmung der Giftgrenzdosis erfolgt an Mäusen. Jeder Versuch wird mit 4—5 abgestuften Dosen angesetzt, wobei für jede Dosis mindestens 4 Mäuse genommen werden. Die Abstufung der Dosen wird am besten so vorgenommen, daß die Tiere 2, 1, 0,5, 0,2 und 0,1 mg erhalten.

In einem Vorversuch bestimmt man die Dosis, die giftig ist, und eine solche,

8) Beard-Pomerence, Amer. J. Physiol. 89, 54 (1929).
9) Holtz-Laquer-Kreitmair-Moll, Biochem. Z. 237, 247 (1931).

Tabelle 22

Gewichtsabnahme und Tod	Zahl der Mäuse	Verkalkung der Nieren nach 10maliger Behandlung und Tötung am 12. Tage		
		Stark bei	Gering bei	Fehlt bei
Über 2,5 g oder tot	1230	62 %	18 %	20 %
Von 0,5 bis 2,5 g	580	18 %	12 %	80 %
Bis 0,5 g oder Zunahme	170	0	2 %	98 %

die noch ungiftig wirkt. Man kann aus dem antirachitischen Wert diese ungefähr schätzen, da im allgemeinen die Giftgrenzdosis die 2000—5000fache der antirachitischen Dosis beträgt. Die Versuche werden an ausgewachsenen, gesunden Mäusen von 16—22 g ausgeführt. Die Tiere werden nüchtern gewogen, trächtige Tiere ausgeschlossen. Die Mäuse werden in Gläsern, wie sie oben abgebildet sind, gehalten. Als Streuunterlage dient Torf oder Holzmehl, als Nahrung Hafer und feuchtes Brot.

Die Darreichung der Präparate erfolgt mit der Schlundsonde nach der Methode von Marks 9a) mit einer in $^1/_{50}$ ccm eingeteilten Spritze. Die Tiere

9a) Marks, J. of exper. Med. 10 (1908).

Tabelle 23. Giftprüfung von Bestrahlungs-

Nr.	Mäuse		Dosen			Konzentration	Gewicht in Gramm nach dem				
	Bezeichnung	Anfangsgewicht g	Glas	mg	ccm	%	1. Tag B (Behandelt)	2. Tag B	3. Tag B	4. Tag B	5. Tag B
1	Rü gelb	20						19,5		17	
2	Na „	20	I	1,0	0,2	0,5		20,5		18	
3	Ko „	19						18,5		17,5	
4	O	21						20		17	
5	Rü gelb	18						17,5		17	
6	Na „	18,5	II	0,5	0,2	0,25		18,5		18,5	
7	Ko „	18						18		17	
8	O	19						18,5		18	
9	Rü gelb	19						18,5		19	
10	Na „	18,5	III	0,4	0,2	0,2		19,5		18	
11	Ko „	18,5						19		16,5 k	
12	O	18,5						19,5		18,5	
13	Rü gelb	18						17,5		15,5 k	
14	Na „	18	IV	0,3	0,2	0,15		18,5		17	
15	Ko „	18						19		18	
16	O	18						18		17,5	
17	Rü gelb	19,5						18		17	
18	Na „	20,5	V	0,2	0,2	0,1		20		20	
19	Ko „	18						17,5		17,5	
20	O	19						19		19,5	
21	Rü gelb	18,5						18		18,5	
22	Na „	19,5	VI	0,1	0,2	0,05		19		18	
23	Ko „	19						19		18,5	
24	O	18						17		17,5	

Ergebnis: Grenzwert 0,3 mg.

erhalten die Dosis morgens nüchtern. Das Volumen soll 0,2 ccm nicht übersteigen. Erforderliche Verdünnungen werden mit Sesamöl hergestellt. (Aufbewahrung in braunen Flaschen. Vermischen der Lösungen durch langsames Umschwenken.) Für jedes Präparat wird eine besondere Spritze verwandt, die täglich mit Äther und Alkohol gesäubert wird.

Die Mäuse werden täglich gewogen. Sie verlieren schon bald nach Beginn der Behandlung ihre Munterkeit. Das Fell wird struppig, die Freßlust läßt nach. Später sitzen die Tiere schlafend in gekrümmter Haltung und zeigen beschleunigte Atmung, die Augen sind meist verklebt. Der Tod erfolgt plötzlich, mitunter auch bevor die Krankheitserscheinungen ausgeprägt sind.

Die Darreichung der Dosen erfolgt insgesamt 10mal, so daß durch den Ausfall des Sonntags die letze Dosis am 11. Versuchstage gegeben wird. Bei jedem der überlebenden Tiere wird die Gewichtsdifferenz von Anfangs- und Endgewicht errechnet und für jede Gruppe das Mittel genommen. Eine Abnahme von über 2,5 g wird als Giftwirkung angesprochen. Kleinere Gewichtsabnahmen sind nicht spezifisch. Außer Gewichtsabnahme gilt als weiteres Kriterium der Tod der Tiere und die Verkalkungserscheinungen in der Niere.

Die während des Versuchs eingegangenen Tiere und die nach Beendigung des Versuchs überlebenden, werden nach dem Töten seziert, um festzustellen,

produkt Kontrollpräparat. Versuch Nr. 330

Gewicht in Gramm nach dem							Gewichts- zu- oder Abnahme am 12. Tag	Zahl der Toten und durchschnittliche Gewichtsabnahme	Verkalkung der Nieren
6. Tag B	7. Tag	8. Tag B	9. Tag B	10. Tag B	11. Tag B	12. Tag			
15,5k		15	tot						geringe Verkalkung
14,5kd	tot								starke ,,
13 k		12,5k		13 k		12 kd	— 7	3 tot	,, ,,
14 kd		13,5kd	tot					— 7	,, ,,
14,5k		15 k		14 k		13 kd	— 5		geringe ,,
16,5k		16 k		16 kd		15,5k	— 3		,, ,,
15,5k		14 k		15 kd		15,5kd	— 2,5		,, ,,
16 k		16,5		14,5kd		13,5kd	— 5,5	— 4,0	starke ,,
19		19		18,5		18	— 1		keine ,,
16 k		15,5		14,5k		15 kd	— 3,5		starke ,,
15,5k		tot						1 tot	keine ,,
16 k		15,5		14,5kd		13 kd	— 5,5	— 3,3	starke ,,
13 kd		12,5		tot					geringe ,,
16,5		16 k		16,5k		16 k	— 2		keine ,,
16,5k		16		15,5		15,5k	— 2,5	1 tot	,, ,,
16		15,5		16		16	— 2	— 2,2	geringe ,,
16,5		16,5		17,5		18	— 1,5		keine ,,
20		20		19,5		20	— 0,5		geringe ,,
16		16 k		16,5kd		15,5kd	— 2,5		keine ,,
20		18,5		19,5		20	+ 1	— 0,9	,, ,,
19		18,5		19,5		19,5	+ 1		keine ,,
18,5		18		18		18	— 1,5		,, ,,
19		19		19,5		19	±		,, ,,
17		16,5		17,5		18	±	— 0,1	,, ,,

Zeichenerklärung: k = krank, d = Durchfall.

ob interkurrente Erkrankungen (Lungenkomplikationen usw.) die Gewichtsabnahme oder den Tod herbeigeführt haben. Alle solche Mäuse scheiden bei der Beurteilung aus. Die Nieren werden auf Kalkablagerungen untersucht. Kalk findet sich sowohl in der Rinde als auch in den übrigen Teilen. Zum histologischen Nachweis des Kalks bedient man sich der Methode von Kossa **9b)** und Nachfärbung mit Alaunkarmin an Gefrierschnitten. Man unterscheidet zwischen starker Kalkablagerung, bei der im Gesichtsfeld eines Schnittes an vielen Stellen sich Kalkablagerungen finden, und schwacher Verkalkung, bei der nur vereinzelte Kalkherde vorkommen. Eine Tabelle über die Beziehung der Gewichtsabnahme zur Verkalkung ist vorstehend wiedergegeben (Tabelle 22).

Die Verkalkung der Nieren geht meist dem klinischen Bild parallel. Im Bereich der Giftgrenzdosis nimmt die Verkalkung ab und fehlt bei kleineren Dosen ganz. Die Stärke der Verkalkung entspricht aber nicht immer der Höhe der angewandten Dosis.

Beispiel: Ein Auswertungsbeispiel geht aus Tabelle 23 hervor.

Wie ersichtlich, nehmen nach der Darreichung von 1 mg des Präparates alle Mäuse an Gewicht ab und gehen am 9. Tage ein. Bei allen Tieren finden sich Kalkablagerungen in der Niere. Tagesdosen von 0,5 und 0,4 mg sind ebenfalls giftig. Die Gewichtsabnahme ist bei der Mehrzahl dieser Tiere noch über 2,5 g. Die Nierenverkalkung erreicht verschiedene Grade. Drei von den vier Mäusen die 0,3 mg erhielten, überleben. Eine zeigt eine Gewichtsabnahme von 2,5 g, die übrigen nehmen weniger ab und zeigen im Durchschnitt eine Gewichtsabnahme von nur 2,2 g. Kalkablagerungen in den Nieren sind bei diesen nicht mehr festzustellen. Kleinere Dosen sind nicht tödlich, die Tiere nehmen im Durchschnitt auch weniger als 2,5 g ab. Die Giftgrenze beträgt 0,3 mg.

Bei verschiedenen Prüfungen schwankt der Giftgrenzwert innerhalb einer Differenz von 50 %. In dem gegebenen Beispiel mit 0,3 mg als Grenzwert wird bei einer Wiederholung der Prüfung die Dosis von 0,4 mg immer giftig sein, während eine solche von 0,2 mg immer ungiftig ist. Die Werte der dazwischenliegenden Dosen überschneiden sich. Ein weiteres Einengen der Giftgrenzdosis kommt also wegen der Streuung nicht mehr in Frage.

Auswertung der Ergebnisse: Die Auswertung der Ergebnisse kann in verschiedener Weise erfolgen.

1. Kann als Grenzdosis diejenige kleinste Menge angesehen werden, die in 10 Tagen bei toten und überlebenden Mäusen eine Gewichtsabnahme von 15 % herbeigeführt hat (Holtz-Schreiber **10)**).
2. Kann als Grenzdosis diejenige Menge gelten, die bei mindestens 50 % der Tiere eine Gewichtsabnahme von über 2,5 g oder den Tod der Tiere herbeiführt (Laquer **11)** und l. c. 9).
3. Gilt als Giftgrenzdosis diejenige kleinste Menge, die bei mindestens 4 Mäusen eine Gewichtsabnahme von durchschnittlich 2,5 g oder den Tod der Tiere herbeiführt, wobei nach höheren Dosen Verkalkung in der Niere nachzuweisen sein soll (Moll **12)**).

Alle drei Arten der Auswertung sind gleichwertig. Ein Beispiel aus den Laboratorien in Göttingen, Elberfeld und Darmstadt möge das erläutern:

9b) Kossa, Beitr. path. Anat. 29, 163 (1901).
10) Holtz c. s., Z. physiol. Chem. 191, 1 (1930).
11) Laquer, Dtsch. med. Wschr. 1931, 243.
12) Moll, Münch. med. Wschr. 1928, 637.

Tabelle 24. KW 52

1. Göttingen:

Tagesdosis in mg	Toxische Wirksamkeit 1	0,5	0,2	0,1	0,07	0,06	0,05	
Gestorben	24	14	12	13	4	—	—	T
Über 15 % G	—	4	7	9	11	3	1	T
10—15 % G	—	—	3	—	—	1	3	T
Unter 10 % G	—	—	2	1	—	—	9	T
Durchschnittlicher G in %	—	27	19	15	31	22	6	ausschließlich Gestorbener
	22,6	32	22	26	32	22	6	einschließlich „

T = Zahl der Versuchsmäuse, die innerhalb von 10 Tagen starben, über 15 %, 10 bis 15 % oder unter 10 % Gewichtsverlust zeigten.

G = Gewichtsverlust innerhalb von 10 Tagen, in Prozent des Ausgangsgewichtes der Tiere.

Giftgrenzwert 0,06 mg.

Tabelle 25

(Fortsetzung von Tabelle 24)

2. Elberfeld:

Tagesdosis in mg	0,20	0,15	0,1
Tot	5	—	2
Schwere Abnahme	1	4	2
Leichte „	—	2	1
Zunahme	—	—	1

Giftigkeitsgrenze (über 50 % schwere Abnahme oder tot): **mindestens 0,1 mg.**

3. Darmstadt:

Tox. Versuch Nr. 257/260

Tagesdosis in mg	Befund der Einzelmäuse bei Versuchsende (Gewichtszu- oder abnahme, tot)				a) Zahl der toten Tiere, b) Durchschnittl. Gewichtsabnahme der überlebenden Tiere	Bemerkungen über Verkalkung, Sonstiges
0,1	—6	—0,5	—4,5	±		Maus 1, 3, 6, 7, 8 starke, Maus 2 geringe, Maus 5 keine Verkalkung
	—1	tot am 8. Tag	—7	—3	1 tot —3	
0,075	—4,5	—1,5	—3	—0,5		Maus 5 starke, Maus 1 und 7 geringe, Maus 2, 3, 4, 6, 8 keine Verkalkung
	tot am 6. Tag	—0,5	—3	—0,5	1 tot —2,2	
0,05	+0,5	—3	—3	tot, interkurr. am 7. Tag		Maus 2 und 3 geringe, Maus 1, 4, 5, 6, 7, 8 keine Verkalkung
	+1	—1	—1	—0,5	—1,2	
0,02	—1	—0,5	—0,5	+0,5	—0,2	

Giftgrenzwert **0,075 mg.**

Die beste Definition der Giftgrenzdosis ist folgende: „Der Giftgrenzwert eines bestrahlten Ergosterins ist diejenige kleinste Tagesmenge pro Tier, die bei mindestens 4 ausgewachsenen Mäusen im Gewicht von über 16 g, in 12 Tagen 10mal verabreicht, entweder die Tiere tötet oder im Durchschnitt eine Gewichtsabnahme von 2,5 g oder mehr herbeiführt, wobei die Mehrzahl der mit höheren Dosen behandelten Mäuse Ablagerungen von Kalk in den Nieren haben sollen."

III. Die biologischen Methoden zur Auswertung des Vitamins D

A. Allgemeines über die Testmethoden auf Vitamin D

Wie bei allen Vitamintestmethoden kann man auch bei den D-Tests prophylaktische und kurative Verfahren anwenden.

Die kurativen Methoden, die besonders im Ausland ausgearbeitet wurden, haben den Nachteil, relativ mehr Zeit in Anspruch zu nehmen als die prophylaktischen, da die Vorperiode ziemlich lang ist. Bei einigen dieser Methoden, z. B. bei den Line tests, ist es außerdem nicht möglich, bei Beginn der therapeutischen Periode den Zustand des Versuchstieres genau festzulegen. Man

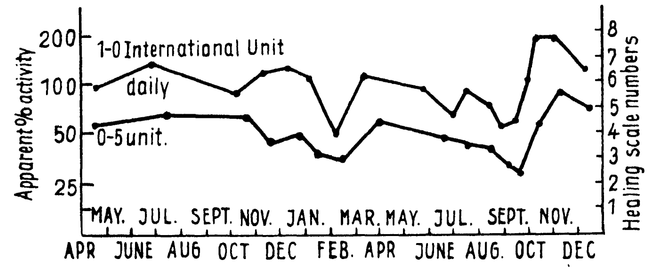


Abb. 30. Die Ergebnisse der Auswertung derselben Vitamin-D-Lösung zu verschiedenen Zeiten.

Jeder Punkt der Kurve wurde an 20 Ratten ermittelt. Links = Aktivität in %, rechts = Grade der aus der Skala abgelesenen Heilung. (Nach Bourdillon.)

kann sich hier nur durch Untersuchung gleichwertiger Kontrolltiere helfen, die aber nicht immer einen Maßstab für gleichbehandelte Tiere desselben Wurfs abgeben. In diesem Punkte sind die kurativen Röntgenmethoden besser, da man hier fortlaufend die Heilung am selben Tier verfolgen kann.

Von den prophylaktischen Methoden ist besonders die Röntgenmethode durch die Arbeiten von Windaus in Deutschland zur höchsten Genauigkeit gebracht worden. Am objektivsten ist die Knochenaschemethode, leider auch am schwierigsten. In erster Hinsicht stehen ihr die prophylaktische Röntgenmethode von Holtz-Laquer-Kreitmair-Moll sowie die kurative Methode von Schultz nahe.

Ein Urteil über die Brauchbarkeit der einen oder anderen Methode ist schwierig zu fällen. Bei Anwendung genügend großen Tiermaterials und bei genügender Erfahrung in Testversuchen scheinen sie gleichwertig zu sein. Wie

bei jeder Testmethode am Tier muß man auch hier mit der schwankenden Reaktionsfähigkeit des tierischen Organismus, d. h. mit nicht näher definierbaren, nicht beherrschbaren Momenten rechnen. Trotz Einhaltung derselben Versuchsbedingungen variiert die Empfindlichkeit der Ratten gegenüber dem Vitamin D. Bei Prüfung desselben (unter Zersetzung ausschließenden Umständen aufbewahrten) Präparats zu verschiedenen Zeiten ist der gefundene wirksame Grenzwert nicht immer der gleiche (Abb. 30).

Es wird deshalb vom Accessory Food Factor Commitee empfohlen, gleichzeitig im selben Test ein Standardpräparat zu prüfen, das international geeicht ist. Auf diese Weise kann man jedes Präparat, gleichgültig nach welcher Testmethode man arbeitet, mit dem Standard vergleichen und so in internationalen Einheiten ausdrücken.

Die gegen die therapeutischen Methoden 13) und besonders gegen den „Line-Test"gemachten Einwände sind bei richtiger Technik nicht stichhaltig. Auch der Fehler des ungleichen Tiermaterials, das zur Behandlung kommt, ist ausschaltbar, wie z. B. aus der Methode von Schultz hervorgeht.

Ganz allgemein zu entscheiden, ob nun prophylaktische oder therapeutische Methoden zu bevorzugen sind, ist nicht möglich, da es jeweils von der verwandten Art der Methode abhängt 14). So ist z. B. der Line-Test nur in der kurativen Form anwendbar. Der Knochenkalktest dagegen nur als Prophylaxeversuch. Ein Vergleich des prophylaktischen Aschetests mit dem kurativen Röntgentest ergibt, daß beide gleichwertig sind. Der Röntgentest hat aber den Vorteil der leichteren Handhabung, ist dafür aber auch bedeutend kostspieliger als der chemische Test. Das gilt auch beim Vergleich der beiden Methoden im prophylaktischen Versuch.

Überhaupt ist die Beziehung zwischen der kurativen Dosis und der prophylaktischen eine viel engere als sich eigentlich aus der Bezeichnung ergibt. Trägt man die am 1., 4., 8., 12., 16., 20., 24. und 28. Tag röntgenoskopisch ermittelten Epiphysenweiten bei rachitogen ernährten Tieren, die entweder unbehandelt waren oder aber steigende Dosen Lebertran prophylaktisch erhielten, gegen die Zeit in ein Koordinatensystem ein, ergibt sich, daß bei den unbehandelten Tieren die größten Epiphysenbreiten am 12. Tage vorhanden sind und von da ab schmäler werden. Mit 1, 2 und 3 mg Lebertran pro Tag sind die Epiphysenspalten am 8. Tage am größten und mit 5, 6 und 10 mg am 4. Tage. Erst mit etwa 20 mg Lebertran pro Tag verläuft die Kurve vollkommen gerade, d. h. die Epiphysenweite ändert sich nicht. Daraus ergibt sich, daß die gewöhnlichen prophylaktischen Methoden eigentlich kurativ sind. Die wahre schützende Dosis liegt höher (Schultzer 15)). Zu der gleichen Feststellung kommt neuerdings Ottokarl Schultz (l. c. 41).

B. Versuchstiere und ihre Haltung

Die gebräuchlichsten Tiere für den Vitamin D-Test sind Ratten. Abweichend von allen anderen Vitamintestversuchen kann Rachitis bei dieser Tierart nicht dadurch erzeugt werden, daß einzig und allein das Vitamin D in der Kost fehlt. Es muß außer dem D-Mangel noch eine Veränderung in der

13) Kreitmair, Erg. Physiol. 30, 202 (1930). — Scheunert-Schieblich, Klin. Wschr. 1929, 699; Biochem. Z. 209, 290 (1929). — Demole, Schweiz. med. Wschr. 177 (1931).
14) Bourdillon-Bruce, Biochemic. J. 26, 506 (1932).
15) Schultzer, Biochemic. J. 27, 376 (1933).

Mineralzusammensetzung der Kost eintreten, bevor sie rachitogene Eigenschaften erhält.

a) Auswahl der Tiere. Rachitis läßt sich nur am wachsenden Organismus erzeugen. Ältere Tiere entwickeln lediglich eine Osteoporose.

Ratten für den Testversuch auf Vitamin D müssen etwa 3—5 Wochen alt sein und ein Gewicht von etwa 30—50 g besitzen. Schwarze oder schwarzweiße Tiere eignen sich für den Versuch ebensogut wie weiße. Laquer und Mitarbeiter (l. c. 9) nehmen 4—6 Wochen alte Tiere, die 33—45 g wiegen.

b) Haltung der Tiere. Je nachdem die Tiere für den kurativen oder prophylaktischen Test bestimmt sind, hält man sie in großen Käfigen zusammen, bis sie eine Rachitis entwickelt haben, oder sie werden gleich von Anfang des Versuchs an in Einzelkäfige gesetzt. Die Größe der Käfige ist so zu wählen, daß nicht etwa durch Beschränkung der Bewegungsfreiheit eine Osteopathie hervorgerufen wird. In einem Käfig von 40 × 40 × 25 cm haben zwei Tiere Platz.

Vielfach gibt man in die Metallkäfige noch Holzwolle. Sie hindert nicht die Entstehung der Rachitis, muß aber öfter durchgeschüttelt und erneuert werden, damit die Tiere die Exkremente nicht fressen. Man kann auch die Tiere in Holzkäfigen halten, die mit einer dünnen Schicht Sägemehl oder Torf bedeckt sind. Diese Schicht muß mindestens wöchentlich erneuert werden. Wir haben gute Erfahrungen mit den oben abgebildeten Holzkäfigen gemacht, die Platz für 5—7 Tiere bieten. Als Einzelkäfige verwenden wir unsere abgebildeten Versuchskäfige. Auch Glaskäfige mit Drahtdeckel, die einen Drahtrost enthalten oder eine Schicht Torfmull, können verwendet werden. Man reinigt sie täglich in einem Spülraum. Größte Sauberkeit ist Vorbedingung des Versuchs.

Die Käfige stehen in einem dunklen Raum. Direkte Sonnenbestrahlung und diffuses Sonnenlicht sind auszuschließen. Der Raum darf nur für Vitamin D-Versuche Verwendung finden. Die Temperatur soll 20—22° betragen und keinen Schwankungen unterworfen sein. Für frische Luft muß gesorgt werden.

Die Tiere werden öfter gewogen. Tiere, die nicht wachsen, sind für den Test unbrauchbar (s. darüber die einzelnen Methoden).

c) Einteilung der Tiere. Man teilt die Tiere für den prophylaktischen Versuch gleich in Serien, für den kurativen Versuch erst nach Beendigung der Vorperiode, während der sie wurfweise gehalten werden. Die Verteilung erfolgt, wie bei allen Testversuchen so, daß jede Serie möglichst gleich zusammengesetzt wird und gleichviel Tiere desselben Wurfs enthält. Für jede zu prüfende Dosis muß man mindestens mit 10—12 Tieren rechnen. Man teilt die Tiere derart auf, daß Gruppen dieser Größe entstehen.

Davon nimmt man stets eine als Kontrolle und verabreicht ein Präparat, dessen Wirkung bekannt ist. Beim prophylaktischen Versuch erhält die Kontrolle keinerlei Behandlung und muß die schwersten Veränderungen zeigen.

d) Fütterung der Versuchstiere. Die Versuchstiere erhalten eine der nachstehenden rachitogenen Diäten und Wasser ad libitum.

Wenn die Tiere in den Versuch kommen, müssen sie erst an das Alleinsein gewöhnt werden. Für den prophylaktischen Test füttert man daher erst 3 Tage lang die rachitogene Diät ohne Zulage der zu testenden Substanz. Bis die Tiere sich an Umgebung und Futter gewöhnen vergehen etwa 2 Tage, in denen sie regelmäßig abnehmen.

Man kann die Tiere auch einige Tage, bevor man sie von der Mutter entfernt, dadurch an das Futter gewöhnen, daß man es ihnen zusammen mit Milch verabreicht und erst dann die Milch wegläßt, wenn sie getrennt werden.

e) Verabreichung der zu testenden Substanz. Die Verabreichung der zu prüfenden Substanz muß, wenn möglich mit der Pipette erfolgen.

Die Lösungen werden mit Olivenöl oder Sojaöl (das antirachitisch unwirksam sein soll) verdünnt, so, daß die Tagesdosis in 0,1 ccm Öl enthalten ist. Die Verdünnungen müssen sehr sorgfältig gemacht werden. Bei der Vermischung muß mindestens 15 Minuten lang langsam hin- und hergeschwenkt werden. Die Verabreichung geschieht mit einer geeichten 1-ccm-Pipette, die nach dem Gebrauch in Benzin, Alkohol, Chromschwefelsäure und Wasser gereinigt und mit Alkohol-Äther an der Saugpumpe getrocknet wird. Kontrolltiere erhalten dieselbe Menge an reinem Lösungsmittel.

Jede zu prüfende Substanz, z. B. Milch usw. muß vorher auf ihren Phosphorgehalt untersucht werden. Zufuhr einer phosphorhaltigen Substanz heilt die experimentelle Rachitis, auch wenn kein D-Vitamin vorhanden ist, was schon zu schweren Irrtümern Veranlassung gegeben hat.

Auf der rachitogenen Kost von Randoin-Lecoq 16) wird das Vorhandensein einer internationalen Einheit D-Vitamin vorgetäuscht, wenn die Zulage enthält:

4,0 mg P in Form von Phosphorsäure
4,5 mg P als Mononatriumphosphat
5,0 mg P als Dinatriumphosphat
7,0 mg P als Trinatriumphosphat
10,0 mg P als Natriumpyrophosphat
15,0 mg P als Natriummetaphosphat.

Die genaue Dosierung der zu untersuchenden Substanz ist von größter Bedeutung. In Amerika wird das Präparat vielfach dem Futter beigemischt. Diese Methode ist nicht nachahmenswert. Wenn man erfahren hat, wie schwer es ist, die von einer Ratte im Laufe von 24 Stunden gefressene Futtermenge zu bestimmen, wird man einsehen, wie ungenau die Dosierung wird.

f) Die Haltung der Zuchttiere. Genau wie bei dem Testversuch auf Vitamin A ist die Zuchtdiät der verwandten Ratten für den Ausfall eines D-Testes von größter Bedeutung. Verschiedentlich wurde die Beobachtung gemacht, daß Ratten gegen den D-Mangel äußerst resistent sind, eine Erscheinung, die auf zu große Reserven zurückzuführen ist. Wir haben selbst vor einigen Jahren die Erfahrung gemacht, daß einige Tiere auf sonst stark rachitogenen Diäten überhaupt nicht rachitisch werden, weil die Mütter dieser Ratten regelmäßig mit Fischabfällen gefüttert wurden.

Zuchtdiäten für Ratten, die für den D-Test Verwendung finden sollen, sind z. B. die Steenbock- und Sherman-Diäten. Auch eine Kost aus Milch, Hafer, Kleie, Gemüse mit Zugaben von rohem Fleisch hat sich bewährt.

In den Laboratorien der I. G. Farben und Merck wird den Zuchttieren folgendes Futter verabreicht (l. c. 9):

5 Teile Maisschrot, 10 Teile Weizen, 8 Teile Milch, 4 Teile Hafer, 5 Teile Brot, 0,025 Teile Calciumcarbonat, 0,06 Teile Kochsalz, mit täglichen Zugaben von wechselnd Gemüse, Fleisch, Rüben, 0,4 Teile Casein oder 2 Teilen Reis.

---

16) Lecoq-Vilette, J. de Pharmacie 1933, 192.

In Göttingen wird folgende Kost gegeben:

Auf 4 Teile Reis 1 Teil Fleischmehl in Wasser weich gekocht. Dazu 1 Teil Weizenschrot + 1 Teil Maisschrot. Ein Löffel Bierhefe, 200 g Natriumchlorid, 200 g Salzgemisch nach McCollum und wöchentlich 2mal rohe Möhren und täglich Roggen nach Belieben.

Wir selbst verwenden eine Kost aus Weizen, Maisschrot und frischer Milch unter Zulagen von Gemüse.

Die Tiere werden jährlich 3mal gedeckt und kommen, wenn sie trächtig sind, in die oben beschriebenen Einzelkäfige. In der Regel bestehen die Würfe aus 6 bis 8 Jungen. Wenn zu große Würfe erhalten werden, ist es gut, die Zahl der Tiere auf 8 zu reduzieren. Zu kleine Würfe sind ebenfalls nicht brauchbar. Wir verwenden solche für die Zucht.

Bourdillon-Bruce und Webster (l. c. 14) füttern die Zuchtratten mit Weizen, Mais oder Hafer, sowie Brot, Gemüse, Fleisch und etwas frischer Milch. Gleichwertig war eine Kost aus:

Weizenmehl (ganzer Weizen)	62 %
Weizenkeime	9 %
Trockenmagermilch	19 %
Hefe	5 %
Fett	5 %
Ferricitrat	0,25 %

dazu täglich 2 g Karotten, Spinat oder Kohl und zweitägig 2 g gekochte Leber.

Während der Laktation erhalten die Tiere 18 bzw. 29 % Weizenkeime und Magermilchpulver, wobei die entsprechende Menge Weizenmehl fortfällt. Die Leberzulage kann ebenfalls während der Laktation reduziert werden.

O. Schultz (l. c. 41) sah mit folgender Kost gute Ergebnisse:

Korn und Mais, dazu Milch (aus Trockenmilch bereitet), Karotten und reichlich trockene Brötchen, außerdem Spinat und Grünkohl und ab und zu etwas rohes Fleisch.

Die Jungen werden mit 4 Wochen abgesetzt und erhalten 3—8 Tage weiter diese Kost, bis sie versuchsreif sind.

Dyer gibt folgende Kostmischung für die Versuchsratten an:

Mais, gelb, gemahlen	65 %
Weizen, ganz gemahlen . . .	20 %
Casein	9 %
Trockenhefe	5 %
Kochsalz	0,5 %
Calciumcarbonat	0,5 %

Die Tiere werden nach der Entfernung von der Mutter mit 32—35 g Gewicht ausschließlich damit ernährt, bis sie 50—60 g schwer sind. Sie erhalten während dieser Zeit außer der Kost etwa 4 g Wasserkresse pro Woche, Hafergrütze und etwa 2 g Leber oder Fleisch pro Woche. Die Tiere sind mit 50—60 g für den Line-Test brauchbar.

C. Vitamin D-arme Diäten

a) Allgemeines über rachitogene Diäten. Die experimentelle Erzeugung einer Rachitis bei der Ratte ist nicht nur bedingt durch die An- oder Abwesenheit des Vitamins D, sondern hängt vielmehr auch ab von dem Verhältnis von Kalk zu Phosphor in der Nahrung.

Eine Kost, in der das Vitamin D fehlt, die aber ein Verhältnis Ca : P = etwa 2 hat, wirkt nicht rachitogen. Diäten aber, bei denen das Verhältnis Ca : P = 3,5—10 ist und in denen außerdem das Vitamin fehlt, erzeugen Rachitis. Die Rachitis ist um so schwerer, je höher der Quotient Ca : P. Milde Rachitis, bei deren Heilung Tetanie auftritt, kann erzeugt werden durch eine Kost mit einem Verhältnis Ca : P = 3,5.

Bei einem Vergleich der in der Literatur niedergelegten Arbeiten ist stets die verwandte Diät zu berücksichtigen. Wenn es z. B. heißt, daß 1 γ eines Präparats imstande ist, die Rachitis zu heilen oder zu verhüten, so gilt das nur für die benutzte Diät. Die Menge an Vitamin D, die verhüten oder heilen kann, ist nur für diese bestimmte Diät dieselbe und ändert sich, wenn eine andere benutzt wird. Die für die Heilung oder Verhütung einer Rachitis benötigte Dosis D-Vitamin ist nicht nur abhängig vom Verhältnis Ca : P der rachitogenen Diät, sondern auch vom absoluten Mineralangebot.

Tritt bei einem konstanten Verhältnis Ca : P Rachitis auf, so wird sie immer leichtere Grade annehmen, je höher das Angebot der Mineralien gehalten wird. Bei einem Gehalt der Kost von 0,5 % P kann durch noch so große Kalkzufuhr keine Rachitis erzeugt werden. Ist die Menge der Kalkzufuhr in der Diät festgelegt, so wird die Rachitis immer schwerer durch Erhöhung des Quotienten Ca : P.

Diese Verhältnisse müssen namentlich auch bei dem Knochenkalktest auf Vitamin D berücksichtigt werden. Der Mineralgehalt der Knochen ist weitgehend von dem Angebot abhängig.

Weiter hängt die Entstehung einer Rachitis von dem Säuregrad der verfütterten Diäten ab. Im allgemeinen besteht die Tendenz, daß bei einer sauren Kost sich eine immer weiter fortschreitende Rachitis entwickelt, während auf einer mehr basischen Diät derselben Zusammensetzung eine Rachitis entsteht, die nach einiger Zeit Heilungstendenz zeigt. Im Verlauf dieser Heilung kann es unter Umständen zur Tetanie kommen. Diese Zusammenhänge sind wichtig bei der Auswahl der Testdiät.

Im Gegensatz zur Rachitis des Kindes, die nur durch Bestrahlung bzw. durch Zufuhr bestrahlter Substanzen geheilt werden kann, ist die experimentelle Rachitis der Ratte heilbar

1. durch Bestrahlung oder durch Zufuhr bestrahlter Substanzen,
2. durch Änderung der Mineralrelation der Kost, derart, daß diese ihren rachitogenen Charakter verliert, also z. B. durch Zugabe von Phosphaten oder organischen Phosphorverbindungen.

Bei der Herstellung der rachitogenen Diäten ist deshalb immer auf den Mineralgehalt der verwandten Getreidearten zu sehen. Es ist bekannt, daß Mais im Phosphorgehalt stark schwankt.

Die für rachitogene Kostformen verwandten Maisbestände müssen in gemahlenem Zustande erst 6 Monate lagern, bevor sie Verwendung finden, weil dadurch die erzeugte Rachitis gleichmäßiger und schwerer wird (Harris 17)). Die Ursache liegt in einem geringen Vitamin D-Gehalt des Maises.

Bevor man einen Versuch ansetzt, muß man sich über den Mineralgehalt der Maissorte orientieren. Der Kalkgehalt beträgt etwa nur 0,05 % und kann vernachlässigt werden. Dagegen schwankt der Phosphatgehalt derart, daß das Verhältnis von Ca : P in der Steenbock-Kost 2965 Werte von 3,9—6,7 erreichen kann. Eine solche Schwankung stört die Auswertung des Vitamins D außerordentlich. Eine Änderung des Quotienten Ca : P von 4 : 1 auf 2 : 1 täuscht bei gleichbleibendem Vitaminangebot einen Mehrgehalt an Vitamin D von 0,7 Einheiten vor (Kay 18)).

Wichtig ist nach neueren Untersuchungen der Magnesiumgehalt der Kost. Eine Magnesiumzulage zur rachitogenen McCollum-Kost wirkt bei ungenügendem D-Angebot stark antirachitisch (v. Euler-Rydbom). Auch der Chlorgehalt einer rachitogenen Diät spielt eine Rolle (György und Mitarbeiter 19)).

Außer von den erwähnten Umständen hängt die Entstehung einer experimentellen Rattenrachitis auch noch von anderen unspezifischen Faktoren ab, so von der Natur der in der Diät enthaltenen Getreideart. Den stärksten rachitogenen Effekt unter den Cerealien übt das Maismehl aus, dann folgen Hafer, Reis und Weizen. Kochen mit Salzsäure schwächt die rachitogene Wirkung (György, l. c. 19).

Erst neuerdings wurden die Verhältnisse durch die Untersuchungen von Bruce und Callow **19a)** geklärt. Danach enthalten die verschiedenen Cerealien keine toxische Substanz. Die unterschiedliche rachitogene Wirkung ist vielmehr durch den Gehalt der Substanzen an Phytinphosphorsäure erklärlich. Bisher wurde in den Substanzen nur der Gesamtphosphorgehalt bestimmt. Dieser gibt aber kein richtiges Bild über die rachitogene Wirkung der Substanz. Eine solche hängt vielmehr ab vom Verhältnis Gesamtphosphor zu Phytinphosphor. Der Phytinphosphor ist für den Organismus nicht verwertbar und deshalb ist die rachitogene Wirkung um so ausgeprägter, je mehr Phytinphosphor eine Substanz enthält. Die rachitogene Eigenschaft wird durch Hydrolyse mit Salzsäure geschwächt, weil dabei die Phytinphosphorsäure zerstört wird und anorganisches Phosphat entsteht. Es handelt sich bei der Salzsäureeinwirkung also nicht, wie bisher angenommen, um die Zerstörung eines Toxins. Alle Cerealien enthalten ein Ferment Phytase, die aus Phytinphosphor bei der Lagerung anorganischen Phosphor freimacht. Dadurch ändern sich aber die Eigenschaften der Diät und damit ändern sich die zur Heilung oder Verhütung der Rachitis nötigen Vitamindosen. Man muß also in Zukunft in den Mehlen nicht nur den Gehalt an anorganischem Phosphat bestimmen, sondern daneben sich auch über den Gehalt an Phytinphosphor orientieren. Die Bestimmung des Phytinphosphor kann nach den Methoden von Heubner-Stadler **19b)** oder Andrews-Baily erfolgen **19c)**.

Erwähnt sei noch, daß wir außer der phosphatarmen Rachitis auch eine kalk-

---

17) Harris c. s., J. Labor. a. clin. Med. 19, 390 (1934); Science (N. Y.) 73, 95 (1931).
18) Kay c. s., Biochemic. J. 26, 196 (1932).
19) György c. s., Z. Kinderheilk. 55, 442 (1933).
19a) Bruce c. s., Biochemic. J. 28, 517 (1934).
19b) Heubner c. s., Biochem. Z. 64, 422 (1914).
19c) Andrews c. s., Ind. Eng. Chem. 24, 80 (1932).

arme kennen, die durch erhöhtes Phosphatangebot zustande kommt. Sie steht jedoch der Spontanrachitis nicht so nahe und wird für methodische Zwecke kaum herangezogen.

b) Rachitogene Kostformen

1. Die Kostform 3143 von McCollum, c. s. 20).

Weizengrieß	33	Teile
Maisgrieß	33	,,
Gelatine	15	,,
Weizenkleber	15	,,
Kochsalz	1	,,
Calciumcarbonat	3	,,

Der Gehalt an Ca bzw. an P in 100 g beträgt 1,20 g bzw. 0,30 g.

Der Weizenkleber (Kleie) wird im Soxlethapparat 12 Stunden lang mit 96%igem Alkohol extrahiert, aus den Hülsen herausgeholt und an der Luft getrocknet. Die Kost wird hergestellt, indem man gepulverte Gelatine in Wasser aufkocht und diese Lösung heiß über die gut gemischten Substanzen gießt. Es ist dabei destilliertes Wasser zu verwenden. Es genügt 1 Liter Wasser für die zehnfache der angegebenen Mengen in Gramm. Die zuerst gut verrührbare Masse wird nach gutem Durchkneten in flache, mit Wasser vorher ausgespülte Schalen gegossen und nach dem Erstarren in Würfel geschnitten. Die Tiere erhalten außer dieser Kost Wasser (dest.) ad libitum, wie bei allen anderen Diäten. Es ist empfehlenswert, nicht zu große Ansätze zur Zeit herzustellen, da sie infolge des Wassergehaltes leicht verderben. Andererseits ziehen wir diese Darreichung der trockenen Verabreichung der Substanzen vor.

Die Kost kann durch Ersatz der 3 Teile Calciumcarbonat durch nur 1,2 Teile in eine nicht rachitogene verwandelt werden. Der Phosphorgehalt beträgt dann 0,276 g, der Kalkgehalt nur 0,542 g pro 100.

Neuerdings empfiehlt Schieblich 21) statt Weizen Buchweizen zu verwenden, da er weniger Phosphor enthält. Dieses Vorgehen verstärkt die rachitogenen Eigenschaften der Kost erheblich. Während bei der Originalkost die Tagesdosis im prophylaktischen Röntgentest bei etwa 0,03 γ liegt, erfordert die neue Form eine Menge von 0,07 γ. Die Empfindlichkeit der Methode leidet durch die Abänderung nicht. Nach wie vor sind im Prophylaxetest Dosen, die um 0,01 γ differieren, deutlich unterscheidbar.

Schon McCollum suchte eine Änderung seiner Kostform, da sich zeigte, daß im Phosphorgehalt zwischen weichem und hartem Weizen erhebliche Unterschiede bestehen. Für die Kost kann nur weicher Weizen Verwendung finden. Aus den Versuchen McCollums ergab sich die Kostform 4025, die aber nicht ideal ist, da sie Butter enthält.

Die Kritik, die die Kostform Nr. 3143 von Steenbock erfahren hat, gründete sich darauf, daß diese Nahrung zu viel Proteine und Gelatine enthalte, was zu Durchfallsstörungen bei den Ratten führe. Auch sei die Kost zu wenig Vitamin-A-haltig. Steenbock hat deshalb als verbesserte Kost seine unten angegebene Nr. 2965 eingeführt.

20) McCollum c. s., Bull. Hopkins Hosp. 32, 160 (1921); J. of biol. Chem. 47, 507 (1921); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 18, 277 (1920); Amer. J. Hygien. 1, 512 (1921).
21) Schieblich, Biochem. Z. 265, 1 (1933).

2. Die Kostform 2965 von Steenbock und Black.

Die Kostmischung besteht aus:

Mais, gemahlen	76 %
Weizenkleber	20 %
NaCl	1 %
$CaCO_3$	3 %

Sie enthält in 100 g etwa 1,2 g Ca und 0,25 g P. Der Weizenkleber wird wie unter 1 mit Alkohol extrahiert. Der P-Gehalt schwankt je nach der Maissorte. Das Verhältnis von Ca : P liegt um 5 : 1. Hess und Weinstock 25), die anstatt Mais (ganz) nur Maismehl verwenden, konnten die rachitogenen Eigenschaften der Kost erheblich verstärken. Das Verhältnis Ca : P ließ sich auf etwa 10 erhöhen.

Die Kostformen 1 und 2 sind die bei Rachitisstudien am meisten benutzten. Andere Mischungen werden in folgender Tabelle gebracht.

Weitere rachitogene Kostformen

Nr.	Autor	Kohlenhydrate	Eiweiß	Fett	Salze
3	Sherman c. s. 22)	95 % Patentmehl	—		Ca-Lactat 2,9 %, NaCl 2 %, Ferricitrat 0,1 %
3a	Dieselben 23)	95 % Patentmehl	—	—	3 % Ca-Lactat, 2 % NaCl
4	McCollum c. s.	40 % Haferflocken 49,2 % Dextrin	—	8,3 % Leinsamenmehl	1 % NaCl, 1,5 % $CaCO_3$
4a	Dieselben	40 % Haferflocken 47,5 % Dextrin	10 % Gelatine	—	1 % NaCl, 1,5 % $CaCO_3$
5	Osborne c. s.	52—56 % Stärke	16—20 % Lactalbumin	0—24 % Speck	4 % P-freie Salzmischung
6	McClendon	62 % Stärke	10 % Lactalbumin	20 % Triolein	2 % P-freie Salze, 0,2 % $CaSO_4$, 0,2 % KH_2PO_4
7	Frost	87 % Stärke	8 % Lactalbumin	—	2 % NaCl, 2 % $CaSO_4$
8	McCollum	40 % Haferflocken 39 % Dextrin	10 % Gelatine 7 % Weizenkleber		Je 1 % NaCl und KCl, 2 % $CaCO_3$
9	Jendrassik 24)	33 % Weizen, gem. 33 % Mais, gem. 10 % Reismehl	15 % Weizenkleber 5 % Gelatine		1 % NaCl, 3 % $CaCO_3$
10	Brown-Shohl	38 % Maisschrot 38 % Maismehl	21 % Weizenkleber		1 % NaCl, 1,87 % $CaCO_3$
11	McCollum	Dieselbe Kost	wie Nr. 8	5 % Butter	
12	Karshan	66 % Maismehl	20 % Weizenkleber, 10 % Eieralbumin	—	1 % NaCl, 3 % $CaCl_2$
13	McCollum	59,96 % Dextrin 3 % Weizenkeime	15 % Weizenkleber 15 % Gelatine	2 % Butterfett	3,9 % Salzgemisch XXI, 1,5 % $CaCO_3$, 0,64 % NaH_2PO_4

22) Sherman-Pappenheimer c. s., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 18, 193 (1920/21); J. of exper. Med. 34, 189 (1921); 35, 421 (1922); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 21, 504 (1923/24).

23) Shipley c. s., Bull. Hopkins Hosp. 32, 160 (1921).

24) Jendrassik c. s., Biochem. Z. 189, 180 (1927).

25) Hess c. s., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 27, 140 (1929).

Nr.	Autor	Kohlenhydrate	Eiweiß	Fett	Salze
14	McCollum	72,6 % Dextrin 3 % Weizenkeime	5 % Weizenkleber 5 % Gelatine 5 % Casein	2 % Butterfett	3,9 % Salzmischung XXI, 1,5 % $CaCO_3$
15	Goldblatt	48 % Stärke	20 % Casein	15 % gehärt. Baumwollsamenöl	5 % Salzgemisch P, 2 % $CaCO_3$
16	Stepp	40 % Hafermehl 51 % Dextrin	5 % Casein	—	1 % NaCl, 3 % $CaCO_3$
17	McCollum	49,35 % Dextrin 5 % Weizenkeime	10 % Gelatine 10 % Eieralbumin 12 % Weizenkleber	5 % Butterfett	1,5 % $CaCO_3$, 5,15 % Salzmischung 37
18	McCollum	52,5 % Dextrin 5 % Weizenkeime	20 % Casein 5 % Gelatine 5 % Weizenkleber	5 % Butterfett	4,3 % Salzmischung 38
19	Randoin c. s. 26)	65 % Rohrzucker	17 % Fleischpepton	5 % Butterfett, 5 % Olivenöl	1 % Ca-Lactat, 4 % Salzgemisch P-frei
20	Haury 27)	30 % Weizenmehl 40 % Glucose	17 % Casein	5,5 % Crisco	2 % $CaCO_3$, 1,5 % NaCl
21	v. Euler 28)	50 % Stärke	18 % Casein	17 % Arachisöl gehärtet	5 % Salzgemisch
22	Zucker	85 % Weizenmehl	10 % Eieralbumin	-	2,8 % Ca-Lactat, 2 % NaCl, 0,2 % Ferricitrat
23	Osborne	75 % Stärke	20 % Edestin		2,6 % Salzmischung

Bemerkungen zu vorstehender Tabelle. Zu Nr. 3 und 3a: Die Kostformen erzeugen schwere Rachitis mit niedrigem Blut-P-Spiegel. Ersatz einer entsprechenden Menge Calciumlactat durch 0,4 g basisches Kaliumphosphat in der Kost Nr. 3 verwandelt sie in eine nicht rachitogene. Lecithin, Fleisch, Hefe schützen entsprechend ihrem P-Gehalt. Casein schützt weniger als seinem P-Gehalt entsprechen würde. Die Kostformen sind unter der Bezeichnung Nr. 84 und 85 bekannt. Die Kost Nr. 3, die namentlich von Hess c. s., Rosenheim c. s. und Hottinger benutzt wurde, ist so stark rachitogen, daß nur sehr reiche D-Präparate damit ausgewertet werden können. Zu Nr. 4 und 4a: Die Kostformen sind unter der Bezeichnung Nr. 2677 und 2806 bekannt. Sie rufen rachitisähnliche Bilder, die zwischen Osteoporose und Rachitis schwanken und mehr an Bilder der heilenden Rachitis erinnern, hervor. 100 g der Kost Nr. 4 enthalten 0,6714 g Ca und 0,21 g P. Die Mischung 4b enthält in 100 g 0,6414 g Ca und 0,1580 g P. Zu Nr. 5: Die Kost erzeugt schwere Rachitis in etwa 35 Tagen. Zur Deckung des B-Bedarfs erhalten die Tiere 40 mg Hefekonzentrat nach Osborne-Wakeman pro die. Zu Nr. 6: Man gibt außerdem noch zur Mischung 5 % Hefe und 1 % Spinatextrakt. Die Kost erzeugt leichte Rachitis. Zu Nr. 7: Die Kost ist unter der Bezeichnung Nr. 341 bekannt. Sie enthält pro 100 g etwa 0,138 g P und erzeugt leichte Rachitis. Es ist nötig, sie durch Zugabe von 1 % Hefe zu vervollständigen. Zu Nr. 8: Die Kost ist unter dem Namen 2127 bekannt. 100 g der Mischung enthalten 0,8 g Ca und 0,20 g P. Die Kost erzeugt bei der Ratte in 3—6 Wochen eine Rachitis, die aber viel weniger schwer ist als die mit der Mischung Nr. 1 erzielte. Zu Nr. 9: Die Kost ist eine Abänderung der Nr. 1, die aber keine wesentlichen Vorteile bietet.

26) Randoin c. s., C. r. Soc. Biol. Paris 97, 1277 (1927).
27) Haury, J. of biol. Chem. 89, 467 (1930).
28) v. Euler, s. Grafes Handbuch der Organischen Warenkunde, Bd. 5.

Zu Nr. 10: Die Mischung ist ebenfalls eine Modifikation der Nr. 1 mit Anlehnung an die Nr. 2. Der Ca : P-Quotient beträgt etwa 4. Zu Nr. 11: Der Butterzusatz wurde gewählt, um die Entstehung der Xerophthalmie auf der Mischung Nr. 8 zu verhüten. Zu Nr. 12: Der Weizenkleber wird extrahiert (s. unter Nr. 1). Jede Ratte erhält außer der Kost täglich 10 g Spinat. Die Mischung enthält ohne Spinat in 100 g etwa 1,22 g Ca und 0,09 g P. Zu Nr. 13: Die Kost ist unter der Bezeichnung 3407 bekannt. Die Weizenkeime werden mit Äther extrahiert, die Kleie mit Alkohol. Die Gelatine darf höchstens 0,12 % P enthalten. Man setzt der Mischung 2 % Agar-Agar zu. Die Kost enthält in 100 g 1,202 g Ca und 0,217 g P. Das Salzgemisch XXI besteht aus: $CaCO_3$ 1,5 Teile, KCl 1,0 Teile, NaCl 0,5 Teile, $NaHCO_3$ 0,7 Teile und $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 Teile. Zu Nr. 14: Die Mischung ist unter der Bezeichnung 3408 bekannt. Sie enthält außerdem 2 % Agar-Agar. Der P-Gehalt beträgt in 100 g 0,202 g und der Ca-Gehalt 0,88 g. Die Salzmischung ist dieselbe wie unter Nr. 13. Zu Nr. 15: Zur Mischung werden weiter 5 % Hefe, 5 % Zitronensaft und 50 ccm destilliertes Wasser gegeben. Die Kost enthält 1,08 g Ca und 0,22 g P in 100 g. Sie ist noch wirksamer, wenn das Casein durch Eieralbumin ersetzt wird. Die Kost ist identisch mit der alten Osteoporose erzeugenden von Korenschewsky, in der kein Calciumcarbonat enthalten war. Die Salzmischung besteht aus NaCl 9,6 Teile, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 16,4 Teile, KCl 24,4 Teile, Calciumlactat 57,5 Teile, Ferricitrat 3,5 Teile. Das Verhältnis Ca : P der Mischung beträgt 5 : 1. Zu Nr. 16: Die Kost ist die Xerophthalmie erzeugende von McCollum, in der 1,5 Teile Dextrin durch Calciumcarbonat ersetzt wurden. Sie ist stark rachitogen. Zu Nr. 17 und Nr. 18: Beide Kostformen werden durch Zugabe von 2 % Agar-Agar ergänzt. Die Kostmischungen erzeugen in 25 Tagen Rachitis. Ihr gesamter P-Gehalt entstammt dem Casein. Die Salzmischung besteht aus: $CaCO_3$ 1,5 Teile, KCl 1 Teil, NaCl 1 Teil, $NaHCO_3$ 0.4 Teile, MgO 0,2 Teile, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 Teile, KH_2PO_4 0,85 Teile. Die Salzmischung 38 ist dieselbe ohne KH_2PO_4. Zu Nr. 19: Die Kost muß weiter etwas Filtrierpapier enthalten. Sie enthält auf 100 g 0,120—0,187 g P und 0,420—0,450 g Ca. Man gibt zur Deckung des Bedarfs 3 % Hefe zu. Zu Nr. 20: Außer den angegebenen Bestandteilen enthält die Kost 2 % Hefe und 2 % Spinattrockenpulver. Sie wird durch Zugabe von je 1 % NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 in eine nichtrachitogene verwandelt. Zu Nr. 21: Die Kost enthält weiter 5 % Marmite-Hefeextrakt und 5 % Zitronensaft. Das Salzgemisch besteht aus: 25 Teilen NaCl, 74 Teilen $CaCO_3$ und 1 Teil Ferricitrat. Zu Nr. 22: Die Tiere erhalten außerdem pro die 2—3 g Spinat. Die Kost ist unter der Bezeichnung 401 bekannt. Sie findet für den Fäzes-pH-Test Verwendung. Zu Nr. 23: Die Salzmischung besteht aus: 21,8 g $MgCO_3$, 30,1 g Na_2CO_3, 118,6 g K_2CO_3, 95,3 g HCl, 9,2 g H_2SO_4, 30,6 g Citronensäure, 5,34 g Ferricitrat, 0,02 g KJ, 0,79 g $MnSO_4$, 0,248 g NaF, 0,0245 g $K_2Al_2(SO_4)_2$. Die Tiere erhalten außerdem die B-Vitamine in Form von Hefe und A-Vitamin in Olivenöl. Die Kost gestattet eine Änderung des Ca : P-Quotienten in jedem Verhältnis, zwecks Studiums der Wirkung einzelner P-Verbindungen auf die Entstehung der Rachitis. Durch geeignete Auswahl der Ca- und P-Verbindungen kann jede gewünschte Reaktion erzielt werden. Die Trockenhefe muß vor der Zugabe mit genügend $CaCl_2$ versetzt werden, um das Verhältnis Ca : P = 1 : 5 zu erhalten. 20 Tropfen Lebertran täglich genügen für normale Entwicklung. Die Versuchstiere erhalten statt Lebertran Olivenöl.

c) Nicht rachitogene, Vitamin D-arme Kostmischungen

Im Gegensatz zu den Kostformen, die außer dem Vitamin D-Mangel noch ein gestörtes Mineralverhältnis aufweisen und beim Tier stark rachitogen wirken, gibt es auch solche Diäten, in denen die Mineralien richtig ausbalanciert sind, in denen also nur das Vitamin D fehlt. Solche in jeder Beziehung bis auf den D-Mangel vollwertige Mischungen werden in bestimmten Versuchen zur Auswertung des Vitamins D herangezogen.

Füttert man Ratten mit diesen Kostformen, so entsteht keine Rachitis, sondern lediglich eine Kalkverarmung des Knochens, die aber durch Verab-

reichung des Vitamins D verhütet oder geheilt werden kann, eine Reaktion, die man als Test heranzieht. Spezifisch für Ratten auf einer solchen Kost ist weiter der Wachstumsstillstand, der ebenfalls auf D-Mangel beruht und durch Zugabe dieses Vitamins zu beheben ist. Auch diese Methode kann als Test dienen.

Die bekanntesten Vitamin D-freien Diäten sind folgende:

a) Steenbock-Black 29):

Casein	18	Teile
Salzgemisch	4	,,
Hefe	8	,,
Agar-Agar	2	,,
Dextrin	68	,,

dazu für je 100 g der Mischung 0,3 g Alfalfa (Vitamin A).

b) Sherman-Stiebeling 30):

Casein extrahiert	18	Teile
Salzmischung Osborne	4	,,
Hefe	10	,,
Kochsalz	1	,,
Spinattrockenpulver	1	,,
Stärke	66	,,

Der Kalkgehalt dieser Kost ist 0,74% Ca, der Phosphorgehalt 0,58% P.

d) Kostmischungen mit hohem Phosphat- aber niedrigem Kalkgehalt (nach l. c. 3)

Kostformen zur Erzeugung der atypischen, kalkarmen Rachitis sind folgende:

Nr. 1	Magermilchpulver (Shohl-Bennett)	10 g
	Hafer	40 g
	Leinöl	5 g
	Kochsalz	1 g
	oder	
Nr. 2	Casein (György-Popoviciu)	22,25%
	Maismehl	71,75%
	Preßhefe	4,0 %
	Salzgemisch McCollum ohne Ca und P-Salze	2,0 %

D. Die einzelnen Testmethoden

a) Die kurativen Methoden des Line-Test

1. Der Line-Test von McCollum-Simmonds-Shipley-Park 31) und Bills-Honeywell und McNair 32).

Der Line-Test geht von der Erscheinung aus, daß Ratten, die mit einer rachitogenen Diät etwa 20 Tage lang gefüttert wurden, eine Rachitis entwickeln, die nach mehrtägiger Behandlung mit der zu prüfenden Substanz, je nach der vorhandenen Vitaminmenge, verschiedene Heilungsgrade zeigt. Die Heilungsstadien werden dabei durch Behandlung des Knochens mit Silbernitrat und Belichtung an einem mehr oder minder vollkommen eingelagertem Kalkband sichtbar gemacht.

---

29) Steenbock c. s., J. of biol. Chem. 61, 405 (1924).
30) Sherman c. s., J. of biol. Chem. 83, 497 (1929); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 27, 663 (1930).
31) McCollum c. s., J. of biol. Chem. 51, 41 (1922).
32) Bills c. s., J. of biol. Chem. 90, 620 (1931).

Etwa 24 Tage alte Ratten, die 35—50 g schwer sind, erhalten 18—24 Tage lang die rachitogene Kost 3143. Am besten sind Tiere aus Würfen, die auf 6 oder 8 reduziert sind. Die Vorperiode darf nicht zu lange ausgedehnt werden, da infolge zu schwerer Schädigung die Ansprechbarkeit auf die Therapie verloren geht. Nach Beendigung der Vorperiode werden die Tiere sortiert (Einzelkäfige). Sie werden in Gruppen aufgeteilt, von denen einige verschiedene Dosen der zu untersuchenden Substanz erhalten, andere als positive und negative Kontrollen dienen. Die Tiere werden 2mal wöchentlich gewogen. Nach 5tägiger Fütterung der zu prüfenden Substanz (die positiven Kontrollen erhalten einen D-Standard, die negativen bleiben unbehandelt) werden alle Gruppen getötet.

Man präpariert die distalen Enden von Ulna und Radius, legt sie für 4 bis 5 Stunden in 10%iges Formalin und halbiert sie nach der Fixierung mit einem scharfen Skalpell in der Längsrichtung. Die beiden Hälften werden für 1—2 Minuten in eine 1,5%ige Silbernitratlösung gelegt, dann mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen und im Tageslicht oder unter einer künstlichen Lichtquelle (Quecksilberlampe etwa 10 Sekunden) belichtet.

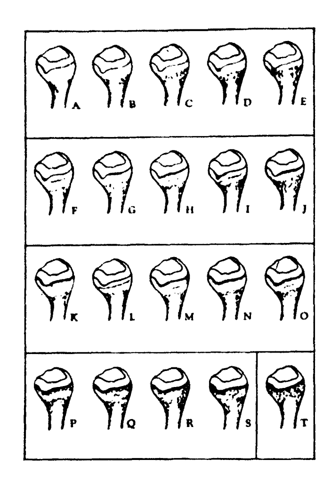


Abb. 31. Skala zur Auswertung der Line-Test-Ergebnisse nach Bills c. s.

Bei schwacher Lupenvergrößerung sieht man den bei der Heilung eingelagerten Kalk in schwarzen Bändern sich abheben. Man erkennt deutlich verschiedene Heilungsgrade, die man mit 0, 1+, 2+, 3+ usw. bezeichnet, und die aus Abbildung 31 hervorgehen.

In der Zusammenstellung sind nicht nur die Grenzen eines jeden Stadiums sichtbar, sondern auch die verschiedenen Typen der Heilung. Der epiphyseale Typ, bei der Kalk in einer Linie am distalen Knorpelende eingelagert wird, ist am häufigsten. Heilung tritt bisweilen auch in der Metaphyse auf. Diaphysale Heilung ist selten und als Test nicht brauchbar.

„A, B, C, D and E are examples of rickets. A, extremely severe rickets, as seen in animals which have received Diet 3143 for a prolonged period; B, severe rickets; C, moderately severe rickets; D, moderately severe rickets with a spot of old calcium evident in the principal tongue of cartilage; E, the poorest type of rickets that can be accepted in controls. F, G, H, I, and J are examples of 1 + healing. F, very slight healing evidenced by a metaphyseal line; G, very slight healing evidenced by a trace of calcium at the distal edge of the cartilage; H and I, slight healing; J, strongest 1 + healing. K, L, M, N, and O are examples of 2 + healing. K, moderate epiphyseal healing; L, moderate metaphyseal healing; M and N, stronger healing; O, strongest 2 + healing. P, Q, R, and S are examples of 3 + healing, in order of increasing calcification. T, shows 4 +, or complete healing."

Auswertung der Ergebnisse: Zur Auswertung der gefundenen Heilung dividiert man die Anzahl der für ein bestimmtes Präparat erzielten +-Zeichen durch die Anzahl der verwandten Tiere. Ergibt sich z. B. die Dosis von x ccm Lebertran pro Tag bei den damit behandelten Tieren: 1 +, 2 +, 2 +, 3 + und negativ, so ist der Wert, den man erhält: $\frac{13}{6} = 2{,}16 +$.

Als Standard führten die Autoren eine Kost mit $\frac{1}{4}$% Lebertran ein, die 2+-Heilung hervorruft (Kost 3143).

Zur graphischen Bestimmung der 2+-Dosis dient folgende Kurve (Abb. 32), aus der man direkt ablesen kann, um wieviel man eine Lösung bei bestimmtem Heilungsgrad verdünnen oder verstärken muß, um eine Heilung von 2+ zu erzielen. Wurde die Wirkung einer Substanz z. B. zu 2,9 + bestimmt, so muß man die Lösung um $^6/_{10}$ verdünnen, um auf den Heilungsgrad 2+ zu kommen. Fand man einen Wert von 1,2 +, so wird die Lösung bei der 1,5fachen Konzentration den Wert 2 + geben.

Beziehung zwischen Versuchsdauer und Heildosis

Die Beziehung zwischen Versuchsdauer und Heildosis geht aus folgender Kurve hervor. Bezeichnet man als 1 diejenige Dosis, die in 14 Tagen täglich verabreicht die Heilung 2+ verursacht, so muß die Dosis um denselben Heilerfolg zu geben, in einem nur 5 Tage dauernden Versuch 6mal größer sein.

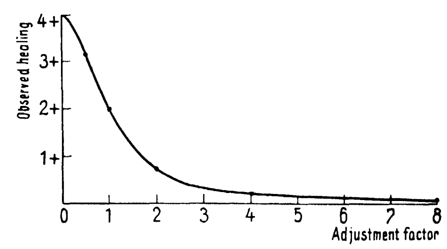


Abb. 32. Kurve zur Umrechnung der Heilung auf die 2+-Dosis. (Nach Bills.)

Die Abbildung kann mit Erfolg benutzt werden, um einige in der Literatur niedergelegten Ergebnisse der Auswertung mit Hilfe des Line-Tests, die nur in der Zeitdauer differieren, umzurechnen.

Aus der Abbildung geht weiter hervor, daß ein Fünftagetest für die Auswertung genügt (Abb. 33).

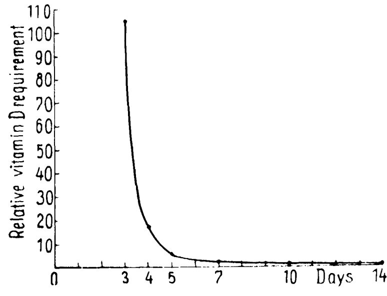


Abb. 33. Beziehung zwischen Versuchsdauer und Heildosis im Line-Test. (Nach Bills.)

Modifikationen der Methode

Modifikation des „line test" wurden von Russell 33), Koch-Ragins 34), Knudson-Moore 35) und Kossa angegeben. Russell verwendet 23—24 Tage alte Ratten, die die Kost 2965 erhalten. Dauer der Vorperiode 20—22 Tage. Gewicht zu Beginn der Versuchsperiode 60—70 g. Dauer der Versuchsperiode 5 oder 10 Tage. 10—14 Tiere für jede zu prüfende Dosis. Die Tiere müssen im Fünftageversuch 4—6 g zunehmen. Als Einheit wird diejenige Menge bezeichnet, die in 10 Tagen die Heilung 1+ hervorruft. Die Heilungsskala ist folgende:

Keine Verkalkung in der Metaphyse	—
Dünne durchbrochene Verkalkungslinie	+—
Dünne fortlaufende Linie	+
Mittlere Verkalkungslinie	++
Breite Verkalkungslinie oder epiphysäres Kalkband	+++
Sehr breites epiphysäres Kalkband oder vollkommene Heilung	++++

33) Russell, J. of biol. Chem. 85, 293 (1929); 93, 699 (1931).
34) Koch-Ragins, J. of biol. Chem. 85, 141 (1929).
35) Knudson-Moore, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 78 (1928); 81 (1929).

Koch und Ragins verwenden Ratten im Alter von 22 Tagen, die sie vor Beginn des Versuchs auf der „stock"-Diät halten, bis sie 45—50 g schwer sind. Rachitogene Diät 3143. Beginn des Versuchs am 15. Tage. Dauer des Versuchs 10 Tage. Auswertung nach dem Schema 2 +, besser als 2 +, schlechter als 2 +. Knudson und Moore kontrollieren den Grad der Rachitis und den Heilungsgrad durch Röntgenaufnahmen. Von Kossa untersucht die Kalkeinlagerung histologisch.

FIG. I. FIG. II.

Abb. 34. Beispiel zum Line-Test. (Nach Coward.)

2. Der Line-Test nach Coward 36).

Entsprechend dem Vorgehen von Steenbock und Black verwendet Coward für den Line-Test 50—60 g schwere Ratten, die mit der Steenbock-Kost 2965 gefüttert werden, bis sie rachitisch sind (etwa 4—5 Wochen). Man hält sie während dieser Zeit wurfweise. Mit Beginn der Versuchsperiode werden die Würfe in Gruppen eingeteilt (Einzelkäfige) und jede Gruppe nun 10 Tage lang mit einer bestimmten Dosis der zu prüfenden Substanz behandelt. Während der Versuchsperiode muß die Futteraufnahme überwacht werden, da selbst eine Hungerpause von nur 2 Tagen zur Spontanheilung der Rachitis führt. Die Tiere werden zweimal wöchentlich gewogen.

Das Besondere der Cowardschen Technik besteht in der Handhabung der Kontrollen. Jeder Wurf wird in zwei Hälften geteilt, von denen die einen steigende Dosen des zu untersuchenden Präparats erhalten, die anderen aber steigende Dosen des internationalen Standardspräparats für Vitamin D. Beispiel: Tabelle 26.

Sämtliche Tiere werden nach 10tägigem Versuch getötet. Präparation, Fixierung und Imprägnierung der Knochen geschieht wie unter 1. angegeben.

36) Coward, Quart. J. Pharmacol. 2, 44 (1929); Biochemic. J. 22, 1221 (1928); 27, 451 (1933); Quart. J. Pharmacol. 1, 27 (1928).

Tabelle 26

Rat	Dose
1	0,00025 g. Cod Liver Oil
2	0,0005 g. ,, ,, ,,
3	0,001 g. ,, ,, ,,
4	0,0025 g. ,, ,, ,,
5	0,005 g. ,, ,, ,,
6	0,00001 mg. Irradiated Ergosterol
7	0,000025 mg. ,, ,,
8	0,00005 mg. ,, ,,
9	0,0001 mg. ,, ,,

Auswertung: Bei schwerer Rachitis ist bei den unbehandelten, negativen Kontrolltieren die ganze Metaphyse durch Silber ungefärbt. Die Metaphyse ist ungewöhnlich breit. Die Verkalkung beginnt mit einem dünnen Streifen in der Metaphyse und schreitet stetig fort bis zur Dosis, die vollkommene Heilung verursacht hat (obere Reihe der Abbildung). War dagegen die erzeugte Rachitis milde, so beginnt die Heilung vom langen Knochen aus gegen die Epiphyse zu (untere Reihe der Abbildung 34).

Die Auswertung im einzelnen erfolgt zunächst durch Vergleich der mit dem Standardpräparat erhaltenen Bilder mit denen des unbekannten Präparats. Dabei sucht man die Dosen der beiden Substanzen auf, die etwa denselben Heilungsgrad ergeben haben. Also z. B.

0,00001 mg des Standardergosterins waren in der Wirkung gleich 0,001 g Lebertran
0,000025 ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, 0,0025 g ,,
0,00005 ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, 0,005 g ,,

Da eine internationale Einheit Vitamin D in 0,0001 mg des Standards enthalten ist, ergibt sich, daß 10 mg des Trans einer Einheit entsprechen. Der Tran besitzt also eine Wirksamkeit von 100 E. pro Gramm.

Zur Orientierung sei angeführt, daß die in vorstehender Abbildung wiedergegebene obere Bilderreihe von Tieren stammt, die 10 Tage lang mit dem Standard behandelt wurden, und zwar erhielten sie: 0,0; 0,00001; 0,00002, 0,00005 und 0,0001 mg des Standardergosterins. Weiter sei eine Tabelle gebracht, aus der die während der Versuchszeit erzielten Gewichtszunahmen der Tiere hervorgehen.

Tabelle 27

Rat	Weight at beginning of preparatory period, 1. 4. 27	Weight at beginning of test period, 29. 4. 27	Weight at end of test period, 9. 5. 27
1	51 g.	69 g.	76 g.
2	54 ,,	86 ,,	93 ,,
3	56 ,,	88 ,,	100 ,,
4	58 ,,	87 ,,	97 ,,
5	60 ,,	91 ,,	98 ,,
6	63 ,,	99 ,,	109 ,,
7	62 ,,	94 ,,	102 ,,
8	57 ,,	83 ,,	89 ,,
9	61 ,,	92 ,,	102 ,,

3. Der Line-Test nach Dyer 37a).

Der Line-Test von Dyer ist insofern wichtig, als Dyer zum erstenmal die Ergebnisse des Line-Test nicht mit +- oder —-Zeichen ausdrückt, sondern eine Standardskala aufstellt, die 6 verschiedene Heilungsgrade enthält. Der Vorteil liegt darin, daß bei einem Vergleich der gefundenen Heilung mit der Skala der Heilwert direkt abgelesen werden kann.

Junge Ratten einer Standardzucht (s. oben) werden mit einem Gewicht von 50—60 g ausschließlich mit einer Kost von 76% Mais, 20% Klebermehl, 3% Calciumcarbonat und 1% Kochsalz ernährt. Der Ca : P-Quotient beträgt 4 : 1. Die Tiere bleiben 3—3,5 Wochen auf der Kost. Sie erreichen dann ein Gewicht von etwa 73 g. Nach Beendigung der Vorperiode werden die einzelnen Würfe (zu je 7 Tieren) aufgeteilt. Mehrere Tiere eines jeden Wurfs erhalten dieselbe Dosis eines Standardpräparats, weitere Tiere aus allen Würfen erhalten dieselbe Menge

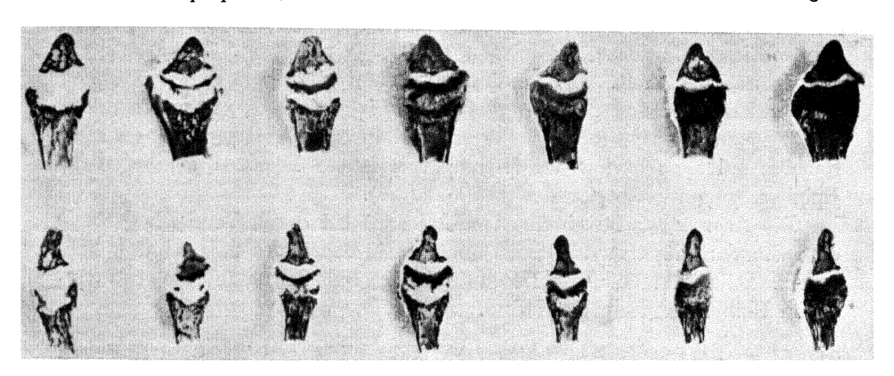


Abb. 34 a. **Standardskala** zur Ermittlung des Heilungsgrades im Line-Test. (Nach Dyer.)
Es entsprechen in der oberen Reihe von links nach rechts die Abb. den Heilungsgraden 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 (unten entsprechend).

der zu untersuchenden Substanz. Die Behandlung dauert 10 Tage. Nach dieser Zeit nehmen die Tiere bis auf 81 g im Durchschnitt zu. Für die Beurteilung des Versuchs wichtig ist, daß aus jedem Wurf ein Tier unbehandelt bleibt und als negative Kontrolle dient. Nach Ablauf der 10tägigen Versuchsperiode werden die Tiere getötet und seziert. Die distalen Enden der Radii und Ulnae werden von anhaftendem Gewebe befreit und in 4%igem Formaldehyd geklärt. Nach 24 bis 48 Stunden werden die Knochenstücke mit destilliertem Wasser gewaschen und mit einem scharfen Skalpell längsgeteilt. Die Einzelstücke werden nun in 1,5%igem Silbernitrat mit der Schnittfläche nach oben 3 Minuten behandelt. Man wäscht mit destilliertem Wasser und belichtet mit dem Licht einer „Tageslichtlampe“ 20—40 Sekunden, bis die verkalkten Teile anfangen zu dunkeln. Die Einzelstücke werden nun in der Reihenfolge der Dosierung mit Leim oder Kitt auf eine weiße Unterlage geklebt und in sechsfacher Vergrößerung photographiert. (Lichtquelle Kohlebogen, dessen Licht durch ein Orangefilter und Kühler mit 0,1% Kaliumbichromat gefiltert wird. Vermeidung der rot-gelben Strahlen und der durch Blut hervorgerufenen Verdunkelungen.)

Die erhaltenen Photographien werden mit der Standardskala verglichen, wobei möglichst mehrere Personen unabhängig den Grad der Heilung für die verschiedenen Gruppen feststellen. Die Standardskala umfaßt die in Abb. 34 a dargestellten Heilungsgrade.

37a) Dyer, Quart. J. Pharmacy a. Pharmacol. 1931, 503.

Die Beurteilung des ganzen Heilungsverlaufs erfolgt aus dem Skalenwert der unbehandelten negativen Kontrolle des Wurfs. Zeigte das Tier eine nur mäßige Rachitis mit einem Skalenwert von über 1,5, werden die gefundenen Werte nach der Kurve 3 der Abbildung 34 b ausgewertet. War die Rachitis des unbehandelten Tieres schwer und zeigte der Skalenwert unter 1,5 Skalenteile an, erfolgt die Auswertung nach Kurve 2 der Abbildung. Beispiele gehen aus folgender Tabelle hervor (Beispiel für leichte Rachitis):

Sample X Margarine. Example 1

Litter	Rat	Dose	Healing assessed by—					Average for Rat	Average for Dose
			KHC.	KMK.	BM.	GKE.	FJD.		
694	4096	No dose	4	4	4	3	3	3,2	
	4097	No dose	1,5	2	2	1,5	2	1,8	
695	4102	No dose	5	5	4,5	5	4,5	4,8	2,8
	4103	No dose	1,5	2	2,5	1,5	2,5	2,0	
H 269	1706	No dose	2	2	2	2	2	2	
	1707	No dose	2,5	3	3	3	3	2,9	
694	4098	0,5 g. X	4	4,5	4,5	4	4	4,2	
	4099	0,5 g. X	5,5	5,5	5,5	5,5	5	5,4	
695	4104	0,5 g. X	5,5	5,5	5	5	5	5,3	4,7
	4105	0,5 g. X	3,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,8	
H 269	1708	0,5 g. X	4,5	5	5	5	5	4,9	
	1709	0,5 g. X	4	5	5	5	4,5	4,7	
694	4100	0,5 unit vit. D	5,5	5,5	5,5	5,5	5	5,4	
	4101	0,5 unit vit. D	5,5	5,5	5,5	5	5	5,3	
695	4106	0,5 unit vit. D	4,5	5	5	4,5	4,5	4,7	5,1
	4107	0,5 unit vit. D	3,5	4,0	4,0	3,5	3,5	3,7	
H 269	1710	0,5 unit vit. D	6	6	6	6	6	6	
	1711	0,5 unit vit. D	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	

Die erhaltenen Mittelwerte geben nach der Kurve 3 ausgewertet für den Skalenteil 4,7 (zu untersuchende Substanz) bzw. 5,1 (Standard) die Werte 0,31 und 0,525. Die Heilung für diesen Rattenwurf beträgt also verglichen mit 0,5 E. Vitamin D für 0,5 g der unbekannten Substanz 0,31 : 0,525. Daher ist:

$$\frac{0{,}5\text{ g der unbekannten Substanz X}}{0{,}5\text{ E. Vitamin D}} = \frac{0{,}31}{0{,}525} = 0{,}590.$$

0,5 g der unbekannten Substanz enthalten also 0,590mal 0,5 internationale E. Vitamin D. 1 g der Substanz besitzt also eine Wirksamkeit von 0,59 i. E.

Die Standardkurve, die bei Benutzung der Methode natürlich mit entsprechend großem Tiermaterial neu aufgestellt werden muß, da sie sich mit der Tierrasse, mit der Ernährung usw. selbstverständlich ändert, ist in Abb. 34 b auf S. 100 angegeben.

4. Der Line-Test nach Key und Morgan 38).

Key und Morgan übernehmen die Bezeichnungen der Skala nach Dyer (l. c. 37 a). Junge Ratten erhalten 3—3,5 Wochen lang eine rachitogene Diät

38) Key c. s., Biochemic. J. 26, 196 (1932).

und werden dann entsprechend 10 Tage lang mit dem zu untersuchenden Präparat behandelt. Ausführung des Line-Tests wie oben. Die einzelnen Würfe werden verschieden gewertet, und zwar unterscheidet man nach dem Zustand des unbehandelten Kontrolltieres zwischen leichter, mittlerer und schwerer Rachitis. Für die Auswertung einer Substanz benötigt man etwa 5 Würfe. Ein Tier eines jeden Wurfes dient als negative Kontrolle und bleibt unbehandelt. Nach Ablesung der Line-Test-Ergebnisse nach der Dyerschen Skala erfolgt die Ermittlung der Wirksamkeit an Hand von Kurven für die verschiedenen Rachitisgruppen. Dabei geht man von dem Zustand des unbehandelten negativen Kontrolltieres aus. Zeigt das Kontrolltier in einem Versuch nach der Skala einen Wert größer als 3, so hat man es mit einer leichten Rachitis zu tun, und die bei den Versuchstieren abgelesenen Skalenwerte werden an der Kurve für leichte Rachitis ausgewertet. Ein Ablesungswert der negativen Kontrolle von 1—3 Skalenteilen bedeutet mittlere Rachitis, ein solcher von unter 1 Skalenteil schwere Rachitis.

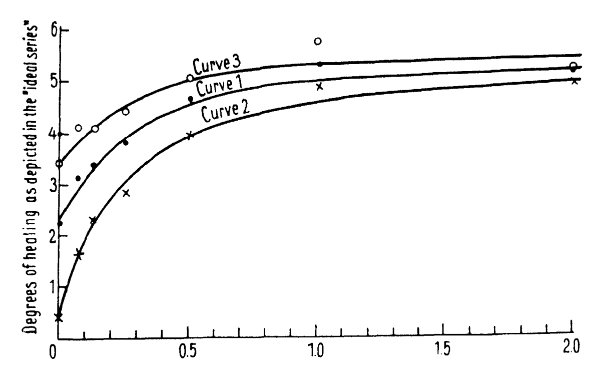


Abb. 34 b. Standardkurven zur Ermittlung der D-Wirksamkeit aus den Skalenwerten. (Nach Dyer.)
(Vitamin D in internationalen Einheiten = Abszisse, an der Ordinate die Skalenwerte nach Dyer.)

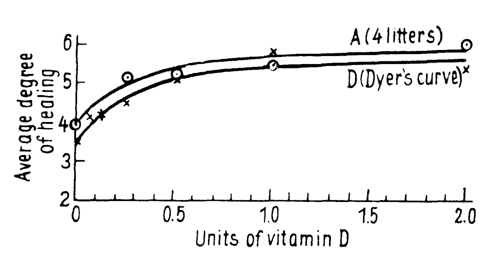


Abb. 35. Die Beziehung zwischen der verabreichten Vitamin D-Menge und dem Heilungsgrad im Line-Test (Dyer-Grade) bei Ratten mit milder Rachitis.
Die Kurve dient zur Ablesung der Vitamin D-Wirkung in intern. E. aus dem Heilungsgrad. (Nach Key.)

Tabellen 28 und 29 zeigen ein Versuchsbeispiel. Daraus geht auch die Verteilung der Tiere eines Wurfs hervor. Die Versuche sind mit steigenden Dosen eines bekannten Präparats angestellt. Wie ersichtlich, zerfallen die Ergebnisse in zwei Teile, da ein Teil der Tiere schwere Rachitis entwickelte, ein anderer aber nicht. Die ermittelten Skalenwerte für die leichte Rachitisgruppe werden nach Abb. 35 berechnet.

Beispiel für die Berechnung der Werte bei leichter Rachitis

Angenommen, der Mittelwert für die unbehandelte Kontrolle in 3 Würfen sei nach der Line-Skala von Dyer 2,8. Die Tiere aus 3 Würfen, die 10 Tage lang je 0,5 g der zu untersuchenden Substanz pro die erhielten, zeigen einen Mittelwert von 4,5 Skalenteilen, und die Tiere, die je 0,5 E. Vitamin D erhielten, einen solchen

Tabelle 28

Litter	Average value for degree of healing shown by rats receiving daily doses of vitamin D				
	No dose	0,25 unit	0,5 unit	1 unit	2 units
		"Slight" rickets group.			
563	4	6	5,75	6	6
573	4,5	6	6	6	6
653	4	3	3,5	4,75	6
688	3	5,5	5,5	5	6
Average	3,9	5,1	5,2	5,4	6,0
		"Severe" rickets group.			
583	0	3,25	4	6	6
589	0	3	5	4	4,75
620	0,5	4,5	5	5	6
622	0	4,5	4,25	5,5	6
644	0	5,5	4	4,25	6
700	0	2	4	5	5
Average	0,08	3,8	4,4	5,0	5,6

von 5,1 Teilen. Da wir es mit einer leichten Rachitisform zu tun haben, erfolgt die Berechnung nach obiger Kurve:

$$\frac{\text{Vitamin D-Gehalt in 0,5 g der Substanz}}{\text{0,5 E. Vitamin D}} = \frac{0,31}{0,525} = \text{0,59 E. pro Gramm Substanz.}$$

Die Werte des Quotienten ergeben sich aus der Skala, indem man an der Ordinate die ermittelten Heilungsgrade aufsucht und die Wirkung dazu an der Abszisse abliest.

Die Berechnung der Werte bei schwerer Rachitis erfolgt nach nebenstehender Kurve. Die beiden Kurven D und C wurden aus zwei verschiedenen Versuchen gewonnen. Die Kurve von Dyer im Vergleich dazu.

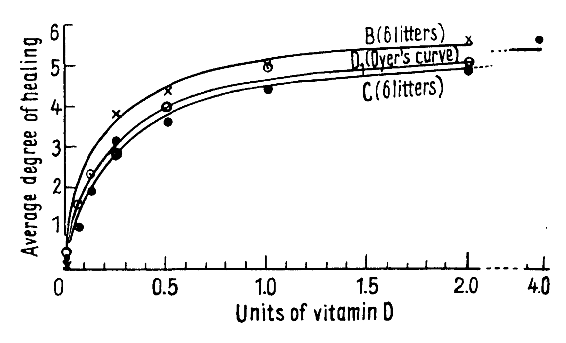


Abb. 36. (Vgl. Abb. 35.) Dieselben Verhältnisse bei schwerer Rachitis.

Beispiel für schwere Rachitis

Der Wert für die negative Kontrolle sei nach Dyer 0,8.
Der Wert nach Behandlung mit 5 mg Öl pro die sei 3,8.
Der Wert für 0,5 E. D sei 4,55.
Die Berechnung der Wirksamkeit erfolgt aus den drei Kurven wie oben:

$$\frac{\text{D in 5 mg Öl}}{\text{0,5 E. D}} = \frac{0,28}{0,54} = \text{0,52 E. D pro Gramm der Substanz.}$$

Die Auswertung nach den anderen Kurven ergibt entsprechend: 0,49 bzw. 0,52 E. pro Gramm. Die Unterschiede bei Benutzung der verschiedenen Kurven sind also nicht erheblich.

Tabelle 29

Litter	Average value for degree of healing shown by rats receiving daily doses of vitamin D							
	No dose	0,0625 unit	0,125 unit	0,25 unit	0,5 unit	1 unit	2 units	4 units
726	0,5	0	4,0	4,7	4,7	5,0	6,0	6,0
741	0,5*)	2,8	2,3	4,3	3,5	3,5	4,3	6,0
737	0	1,2	1,2	4,2	4,2	4,8	6,0	5,5*)
819	0,6*)	0,7	1,8	1,8	2,5	4,2	4,8	5,2
833	0	0,7	1,0	2,2	3,8	4,3	5,2	6,0
818	0,2	0,8	1,3	1,7	3,2	4,5	3,2	4,8
Average	0,30	1,0	1,9	3,15	3,65	4,4	4,9	5,6

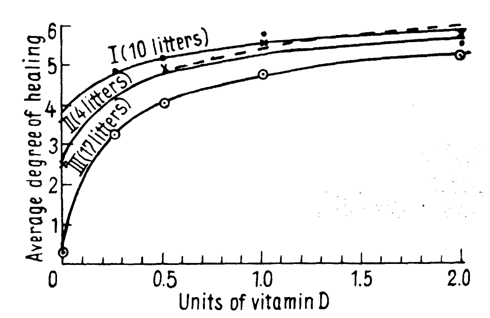


Abb. 37. Auswertung der Vitamin D-Einheiten aus den Heilungsgraden bei leichter (I), mittlerer (II) und schwerer (III) Rachitis. (Nach Kay.)

Um die Ablesung zu erleichtern, haben die Autoren weiter die nebenstehende Kurve angegeben, nach der alle Grade von Rachitis ausgewertet werden können. Dabei bedeuten die Kurven nach der Reihenfolge 1, 2 und 3 leichte, mittlere und schwere Rachitis.

5. Der Test von Heubner und Frerichs 39).

Heubner und Frerichs verwenden einen modifizierten Line-Test. Junge Ratten, 4 Wochen alt, werden mit einem Gewicht von 35—55 g in den Versuch genommen. Sie werden in verdunkelten Räumen in Glaskäfigen mit Torfstreu bei 18—20^0 gehalten und mit der McCollumschen Diät 3143 oder der Kost von Steenbock 2965 ernährt. Mindestens 10 Kontrolltiere erhalten dieselbe Kost.



Abb. 38. Links keine Rachitis, in der Mitte Rachitis I—II, rechts Rachitis II—III. (Nach Heubner.)

Bei eingetretener Rachitis werden die Tiere 14 Tage lang behandelt, und zwar erhalten sie mit einer Pipette in Mengen von 0,1 ccm einer öligen Lösung die zu prüfende Substanz. Bei der Bewertung des Versuchs scheidet unter den 11 Tieren, die für eine Dosis angesetzt werden, jeweils das Tier aus, das während des Versuchs am stärksten an Gewicht zunahm. Selbstverständlich sind auch die Tiere unbrauchbar, die während dieser Zeit Gewicht verloren.

Am 14. Tage werden die Tiere getötet, das proximale Ende der Tibia herauspräpariert und durch einen Längsschnitt in der Mitte in möglichst zwei gleichwertige

*) Average of values from 2 rats.

39) Heubner-Frerichs, Arch. f. exper. Path. 165, 561 (1932).

Teile zerlegt. Diese werden in einem dunklen Raum ½ Stunde lang mit einer Lösung von 1% Silbernitrat behandelt, darauf mit einer 2%igen Glaubersalzlösung gewaschen und mit einer Quarzlampe belichtet (etwa 3—4 Minuten), bis eine deutliche Schwärzung zu erkennen ist.

Die Betrachtung erfolgt unter 16facher Vergrößerung. Abb. 38 zeigt ein Beispiel.

Diejenigen Versuche, in denen die Kontrolltiere keine oder nur eine leichte Rachitis zeigen, werden verworfen. Mindestens 8 Kontrolltiere müssen rachitisch sein. Die Auswertung erfolgt an Hand von Diagrammen. Abb. 39 zeigt ein Beispiel.

Die Ergebnisse werden nach dem Grad der Rachitis mit gut, stark, sehr gut bezeichnet. In den Diagrammen entspricht etwa die Höhe der Säule der Breite des Epiphysenknorpels. Da diese auch bei gesunden Tieren etwas variiert, sind unterhalb der Normallinie die besonders schmalen Knorpelbreiten durch die halbe Höhe des Normalen gezeichnet.

Man zeichnet für den Kontrollversuch und für den Auswertungsversuch ein Diagramm, in dem die Rachitisgrade 0, 1, 2 und 3 auf der Ordinate liegen. Die Beurteilung erfolgt durch Zahlen, z. B. bedeutet 2,5, daß von 10 Tieren 5 eine sehr starke und 5 eine starke Rachitis aufwiesen, oder es kann auch bedeuten, daß 6 eine sehr starke, 3 eine starke und 1 eine gute Rachitis hatten. 0,8 bedeutet den geringsten zulässigen Rachitisgrad der Kontrollen ($^{8}/_{10}$ Tiere gute Rachitis), 0,6 bezeichnet den höchsten zulässigen Rachitisgrad der Versuchstiere (2 Tiere sehr starke Rachitis). 0,6 bedeutet auch eine Rachitis von Grad 1 bei 6 Tieren oder eine solche von Grad 3 bei 2 von 10 Tieren.

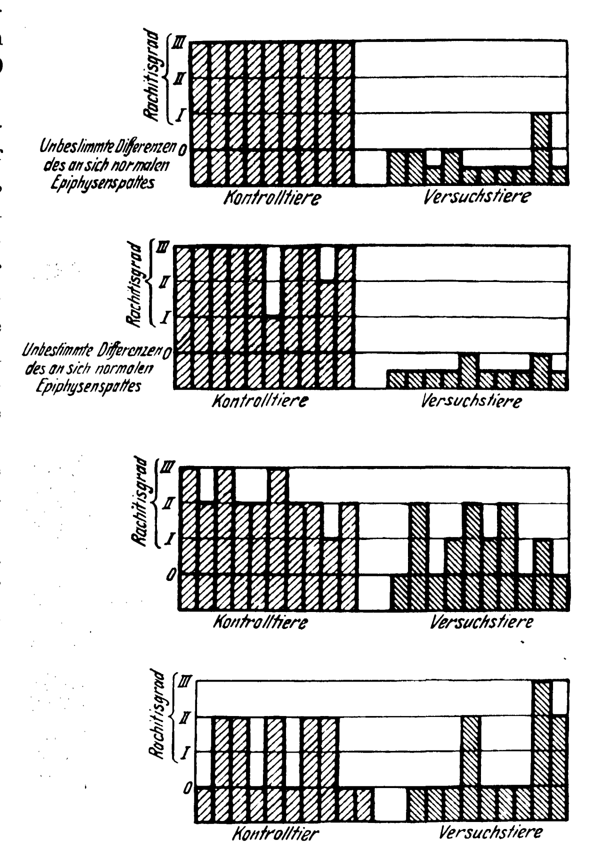


Abb. 39. Obere Abb.: Beispiel für „ausreichenden Schutz", Kontrolltiere 3,0, Versuchstiere 0,1.
Zweite Abb. von oben: Beispiel für restlosen Schutz, Kontrolltiere 2,7, Versuchstiere 0.
Dritte Abb. von oben: Beispiel für unzureichenden Schutz, Kontrolltiere 2,2, Versuchstiere 0,9.
Untere Abb.: Beispiel für unbrauchbaren Versuch, 5 Kontrolltiere ohne Rachitis (1,0), Versuchstiere 0,8. (Nach Heubner.)

Eine Zahl unter 0,3 entspricht einem ausreichenden Rachitisschutz und eine höhere Zahl einem nicht mehr ausreichenden Schutz.

Vollkommen normal gefütterte junge Ratten, die Milch, Brot, Mais und Rüben sowie Fleisch erhielten, scheinen doch unter einem gewissen Mangel an Vitamin D zu leiden, da sie breitere Epiphysenknorpel aufweisen als solche, die antirachitisch, aber unter Zulage des D-Vitamins gehalten wurden.

6. Der Line-Test nach Morgan 40).

Die Modifikation des Line-Tests nach Morgan beruht auf der Messung der verkalkten Zone vor der Mattscheibe bei starker Vergrößerung mit einem Planimeter.

Junge Ratten werden im Alter von 23 Tagen von der Mutter entfernt und erhalten weiter 1 Woche lang, bevor sie in den Versuch kommen, die Zuchtdiät. Sie

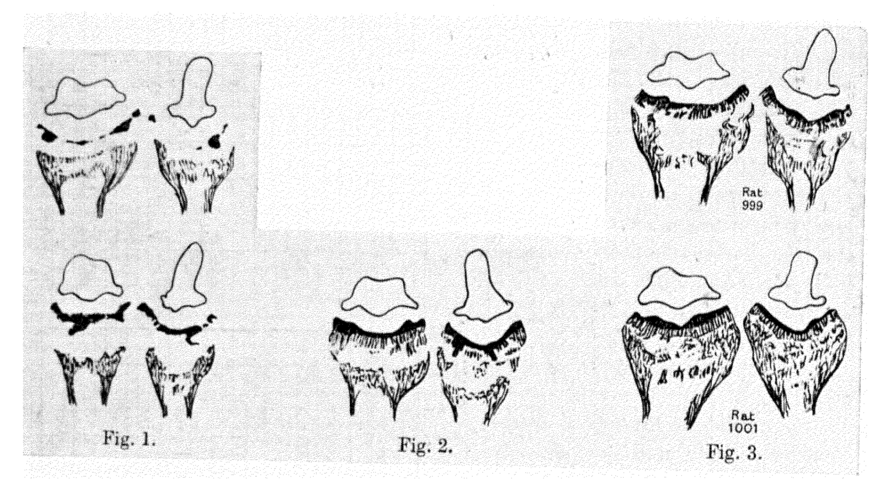


Abb. 40. Fig. 1: Die Heilung nach kleinen Vitamin D-Dosen bei Ratten mit schwerer Rachitis. Fig. 2: Heilung nach mäßiger Dosis. Fig. 3: Heilung bei Tieren desselben Wurfs die $^1/_2$ E. Vitamin D erhielten. Obgleich Ratte 999 eine viel schwerere Rachitis aufwies, ist die gemessene Heilung bei beiden Tieren fast gleich. (Nach Morgan.)

besteht aus: Weizen und Mais unter Zugabe von 10% Magermilchpulver, 5% Hefe, 2% Palmöl (rot), 10 ccm frischer Milch pro die, 2,3 E. D-Vitamin täglich und 10 g Kohl pro Woche und Tier. Eine Woche nach der Geburt wird die Milchzulage und die Vitamin D-Zulage abgesetzt. Mit dem 30. Tag werden die Tiere 3—4 Wochen lang ausschließlich mit der rachitogenen Diät 2965 nach Steenbock ernährt.

Dann erhalten sie 10 Tage die zu untersuchende Substanz. Am 10. Tage werden sie getötet. Die distalen Enden von Radii und Ulnae werden präpariert und über Nacht in Formalin gelegt. Man zerteilt die Knochen und behandelt die beiden Hälften mit Silbernitrat. Die geschwärzten Stücke legt man in eine kleine Schale und bedeckt sie mit Wasser. Dann vergrößert man mit einem gewöhnlichen Photoapparat und mißt auf der Mattscheibe bei 11facher Vergrößerung die geschwärzten Flächen mit einem Planimeter aus.

Abb. 40 zeigt ein Beispiel.

Es ergibt sich daraus, daß bei schwerer Rachitis der neueingelagerte Kalk eine scharf umrissene, leicht ausmeßbare Linie ist. War die anfängliche

40) Morgan c. s., Biochemic. J. 26, 1144 (1932).

Rachitis weniger schwer, so ist der geschwärzte Bezirk nicht scharf. Man muß dann eine Zone mit scharfer Begrenzung messen und weiter eine solche mit verstreuter Verkalkung. Von dieser Zone nimmt man zur Auswertung die Hälfte. Man mißt stets die verkalkte Zone von Radii und Ulnae und drückt den Wert bei 11facher Vergrößerung in Quadratmillimeter aus.

War die Zone mit starker Verkalkung 127 qmm und die Zone mit verstreuter Verkalkung 121 qmm, so ergibt sich für die gesamte Verkalkung ein Wert $127 + \frac{121}{2} = 187$ qmm.

Ein Auswertungsbeispiel geht aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 30. Assay of a sample of vitamin D concentrate

Litter	Rat	Dose	Area of new calcification mm.^{2}	Litter	Rat	Area of new calcification mm.^{2}
146	1103	Negative control	0	148	1118	0
	1110	,,	0		1119	0
	1102	$^1/_4$ unit standard	92		1115	115
	1112	,,	88		—	—
	1113	,,	103		—	—
	1105	$^1/_2$ unit standard	198		1116	160
	1108	1 unit standard	243		—	—
	1101	$0{,}125 \times 10^{-5}$ g. conc.	119		1117	131
	1107	,,	99		—	—
	1111	,,	127		—	—
	1104	$0{,}25 \times 10^{-5}$ g. conc.	159		1114	147
	1109	,,	167		—	—
	1106	$0{,}5 \times 10^{-5}$ g. conc.	167			

Dabei sind an zwei Würfen von Ratten verschiedene Dosen eines Standardpräparats und solche eines unbekannten Konzentrats ausgewertet.

Mit dem internationalen Standard ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 31

No. of rats	Dose of standard preparation units	Average healing produced (mm.^{2} on 11 × magnified drawing)
44	0,125	72
58	0,25	125
43	0,50	185
6	1,00	247

Durch eine große Anzahl Versuche konnte festgestellt werden, daß die Dosis, die eben sichtbare Kalkeinlagerungen macht, etwa 0,056 E. beträgt. Weiter wurde gefunden, daß bei der Halbierung oder Verdoppelung einer Dosis, die in Quadratmillimeter gemessene Heilung sich um eine konstante Größe vermindert oder vermehrt. Diese Zahl beträgt im Durchschnitt 59 qmm.

Die Auswertung der gefundenen Heilung kann auf zweierlei Weise geschehen. Die erste Methode besteht darin, daß man mit Hilfe der Verdopppelungskonstante von 59 qmm z. B. die in obiger Tabelle befindlichen Werte für den Standard und für die Unbekannte auf zwei Werte umrechnet, nämlich auf

0,5 E. des Standards und auf $0,25 \times 10^{-5}$ g des Unbekannten. Das geschieht, indem man die Konstante 59 qmm entweder von dem ausgemessenen Wert abzieht oder dazuaddiert. Man erhält dann von jedem Wurf die Mittelwerte der Heilung für beide Substanzen.

Die Berechnung der Einheiten erfolgt nach der Gleichung:

$$(y_1 - y_2) = 196 \log \frac{x_1}{x_2},$$

wo y_1 und y_2 die Differenz der Heilung und x_1 und x_2 die Beziehung der Dosen sind. Danach ergibt sich für den Wurf Nr. 146 mit der Dosierung $0,25 \cdot 10^{-5}$ g

$$168,4 - 159,3 = 196 \log \frac{0,5}{x}.$$

$$x = 0,45 \text{ Einheiten.}$$

Der Wurf 148 ergibt mit derselben Dosis:

$$168,5 - 167 = 196 \log \frac{x}{0,5}.$$

$$x = 0,508 \text{ Einheiten.}$$

Die Zahlenbeispiele sind folgender Tabelle entnommen:

Tabelle 32

Litter	Rat	Healing produced by 1/2 unit standard	Rat	Healing produced by $0,25 \times 10^{-5}$ g. concentrate
146	1102	92 + 59 = 151	1101	119 + 59 = 178
	1112	88 + 59 = 147	1107	99 + 59 = 158
	1113	103 + 59 = 162	1111	127 + 59 = 186
			1104	= 159
	1105	= 198	1109	= 167
	1108	243 — 59 = 184	1106	167 — 59 = 108
		Average = 168,4		Average = 159,3
148	1115	115 + 59 = 174	1117	131 + 59 = 190
	1116	= 160	1114	= 147
		Average = 167		Average = 168,5

Als Mittelwert ergibt sich (bei Berücksichtigung der Zahl der Tiere in jedem Wurf) für die fragliche Dosis 0,466 E. Die Umrechnung auf Einheiten pro Gramm erfolgt nach:

$$0,466/(0,25 \cdot 10^{-5}) = 186000 \text{ E. pro Gramm.}$$

Die zweite Berechnungsart ist anwendbar, wenn die Würfe gleich viele Tiere enthalten, wenn man also gleichviel Paare hat, die mit Standard und Unbekanntem behandelt wurden. Bei Weglassung der Ratte 1104 in obiger Tabelle sind die Unterschiede in der Heilung für die zwei Dosen:

Tabelle 33

92 — 119 =	— 27
88 — 99 =	— 11
103 — 127 =	— 24
198 — 167 =	31
243 — 167 =	76
174 — 190 =	— 16
160 — 147 =	13
Average =	6,0

Diese Differenz entspricht einem Verhältnis von Standard zu Unbekanntem wie 1,073. Die unbekannte Substanz enthält also in $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ g 1/1,073 E. 1 g hat 186000 E.

7. Bemerkungen zum Line-Test.

Beeinflussung des Ergebnisses durch Farbe und Geschlecht: Farbe und Geschlecht der zur Verwendung kommenden Tiere haben entgegen früheren Vermutungen auf den Line-Test keinen Einfluß. Ebenso ist das Anfangsgewicht bei Verabreichung der Dosis gleichgültig. Jahreszeitliche Abweichungen der Ergebnisse sind dagegen nicht auszuschalten. (Nur bei Prüfung gegen ein Standardpräparat.)

Einfluß der Gewichtszunahme: Es muß gefordert werden, daß alle Tiere während des 10 tägigen Testversuchs etwa 5 g oder mehr an Gewicht zunehmen. Nicht gedeihende Ratten zeigen Spontanheilung!

Verabreichung der zu prüfenden Substanz: Die Verabreichung aller zu prüfenden Präparate hat mit der Sonde oder mit der Pipette zu erfolgen. Das Vermischen mit dem Futter (z. B. die Verabreichung einer Kost mit ¼% Tran) ist zu ungenau, da sämtliche Methoden zur Bestimmung der gefressenen Futtermengen bei der Ratte versagen.

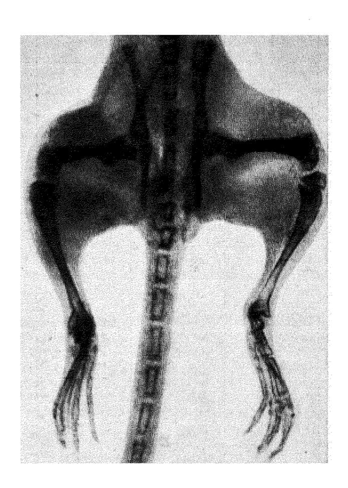


Abb. 41. Normalratte von 41 Tagen. (Nach Schultz.)



Abb. 42. Normalratte von 62 Tagen. (Nach Schultz.)

Fehlergrenzen: Bei Verwendung von 20 Ratten pro Dosis beträgt die Fehlergrenze 10%, bei 10 Tieren etwa 17%.

Fehlermöglichkeiten: Fehlermöglichkeiten sind gegeben bei der Darreichung öliger Lösungen mit der Pipette (stets dieselbe Temperatur des Öls, dieselbe Ausflußgeschwindigkeit, dieselbe Neigung der Pipette) und natürlich bei der Beurteilung der Heilungsgrade. Coward fand bei Ablesung derselben Person zu verschiedenen Zeiten Differenzen von 0,25 Skalenteilen nach der Dyerschen Skala. Das sind etwa 5% der verabreichten Dosis.

b) Die kurativen Röntgenmethoden

1. Der kurative Röntgentest von Ottokarl Schultz 41).

Vier Wochen alte Ratten im Gewicht von 30—50 g erhalten 12—14 Tage lang die Kost 3143. Die Tiere werden zu Beginn und Ende der Vorperiode

41) Ottokarl Schultz, Z. Kinderheilk. 47, 472 (1929); Erg. Path. 28, 393 (1934).

geröntgt. Das Ergebnis muß eine ++++-Rachitis sein, d. h. eine Rachitis, bei der der Spalt der aufgehellten Metaphyse (unverkalkter Anteil) um 1,8 mm (in der alten Fassung mindestens 2,0 bis höchstens 2,5 mm) beträgt. Man teilt die Tiere nach den allgemeinen Regeln in Gruppen auf und verabreicht jeder

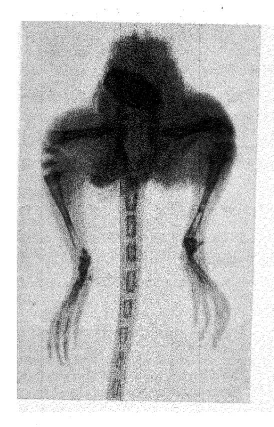


Abb. 43. Kontrollratte von 41 Tagen. (Nach Schultz.)

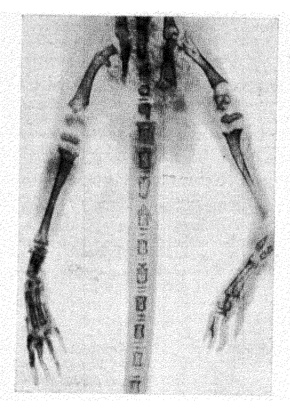


Abb. 44. ++++ Rachitis. (Nach Schultz.)

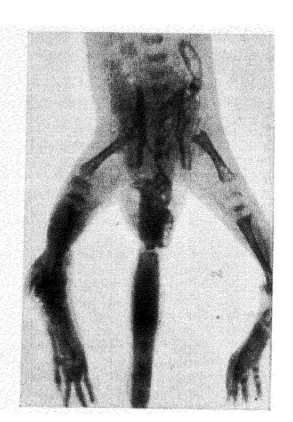


Abb. 45. ++++ Rachitis. (Nach Schultz.)

Gruppe eine bestimmte Dosis der zu prüfenden Substanz. Die Dauer der Versuchsperiode beträgt 6 Tage (nach der alten Fassung 21 Tage). Für jede Dosis sind mindestens 10 Tiere (nach der alten Fassung 4) erforderlich. Zu jeder Gruppe werden 4 Tiere aus den Würfen, die die Gruppe bilden, mit Standardergosterin als Kontrolle zugeteilt. Die Beurteilung der Heilung erfolgt aus dem Röntgenbild, das am Ende der Versuchsperiode angefertigt wird. Die Tiere sind während der ganzen Versuchsdauer täglich zu wiegen. Ratten, die während der Vorperiode nicht gedeihen, sind auszuschalten. Es wird für die 6tägige Versuchsperiode eine Gewichtszunahme von mindestens 3 g gefordert.

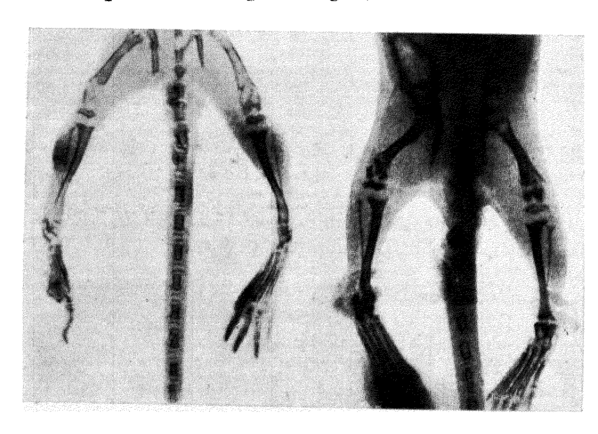


Abb. 46. Zwei Ratten mit ++++ Rachitis. (Nach Schultz.)

Auswertung:

Alte Fassung: Die Auswertung geschah nach der früheren Vorschrift aus der Weite des Epiphysenspalts nach der Formel: $x = r_1 - r_2$, in der r_1 den Epiphysenspalt des rachitischen und r_2 den des geheilten Tieres darstellt. Als positiv ist ein

Versuch anzusehen, der entweder bei allen 4 Tieren x größer als 1,8 werden läßt, oder bei 3 Tieren zu einem x über 1,8 führt. Zweifelhaft ist die Bestimmung, wenn x bei 2 Tieren kleiner als 1,8 ist. Negativ ist der Versuch, wenn bei 3 oder mehr Tieren x unter 1,8 liegt.

Neue Fassung: Positiv oder antirachitischer Grenzwert ist die kleinste Menge eines Präparats, die nach 6 Tagen bei ++++-rachitischen Ratten einen Kalkniederschlag in der kalkfreien Metaphyse bewirkt und eine nur noch nicht mehr sicher meßbare Randspalte zurückläßt. Bedingung: gleiche Wirkung des Standards.

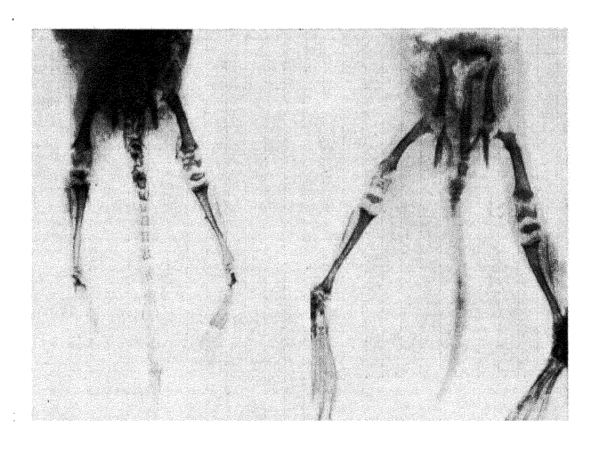


Abb. 47. Zwei Ratten mit ++++ Rachitis. (Nach Schultz.)

Beurteilung der Röntgenaufnahmen: Abb. 41 und 43 zeigen Normaltiere im Alter von 41 Tagen mit einem engen Metaphysenspalt von 0,2 mm. Abb. 42 zeigt dieselben Tiere im Alter von 62 Tagen. Sie haben schon eine praktisch geschlossene Metaphyse mit einem Spalt unter 0,1 mm. Die verschiedenen Maße des Epiphysenspalts gehen aus folgender Tabelle hervor.

Es bedeutet ein Metaphysenspalt von

0 —0,4 mm	= —
0,41—0,64 mm	= (+)
0,64—0,99 mm	= +
1,0 —1,49 mm	= ++
1,5 —1,99 mm	= +++
2,0 —2,5 mm	= ++++
über 2,5 mm	= +++++.

Tiere mit +++++-Rachitis sind für Testversuche unbrauchbar, da sie zu schwer geschädigt sind.

Die Technik der Röntgenaufnahme bei der Ratte

Die für viele Zwecke angewandte Aufnahmetechnik in leichter Narkose ist zwar von einer Reihe von Vorzügen begleitet, bringt aber zahlreiche Todesfälle mit sich, so daß sie nicht zu empfehlen ist.

Besser ist die Technik, die Ratte in einem Rahmen einzuspannen, um die Zuckungen auf ein Minimum zu beschränken. Die Gefahr unscharfer Aufnahmen durch kleine Zuckungen ist natürlich immer noch vorhanden. Deshalb empfiehlt es sich, mit hohen Milliamperes zu arbeiten, um eine möglichst kleine Aufnahmezeit zu erzielen.

Die Aufnahmen werden am besten bei einem Abstand Fokus—Haut von 60 cm ausgeführt (20—30 Milliampere und 55—60 Kilovolt effektive Belastung in einer

Expositionszeit von $^2/_{10}$—$^4/_{10}$ Sekunden). Die Aufnahmen müssen stets im gleichen Abstand und mit derselben Härte vorgenommen werden, da eine Beurteilung der Kalkablagerung durch mehr oder weniger hohe Durchschlagskraft der Strahlen beeinträchtigt wird. Zur Beurteilung kommt ausschließlich die Tibiametaphyse.

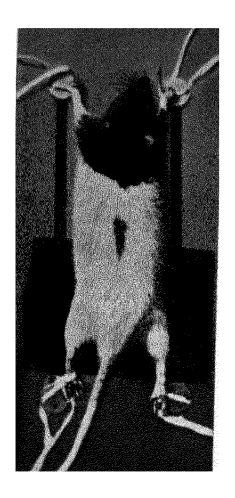


Abb. 48. Zweckmäßiges Röntgen. Einwärtsdrehen der Füße. (Nach Schultz.)

Aus Abb. 48 geht die Lage des Tieres während der Aufnahme hervor.

Von größter Wichtigkeit ist die Lage der Extremitäten. Die Fibula muß stets seitlich von der Tibia liegen, weil sonst die knöcherne Epiphyse der Fibula auf die Höhe der Tibiametaphyse kommt und dadurch eine Beurteilung unmöglich macht. Eine seitliche Lagerung der Fibula erreicht man durch Einwärtsdrehen der Füße nach erfolgter Ausspannung des Tieres (s. Abb. 49).

Neuerdings wird vorgeschlagen, nur das rechte Hinterbein zu röntgen und dabei auf die Einspannung des Tieres zu verzichten. Schultz gibt folgende Technik: „Zur Aufnahme wird die Ratte zunächst lose in der linken Hand gehalten und bis zum Beginn der Aufnahme öfter angesprochen und gestreichelt. Erst kurz vor der Belichtung zieht man das rechte (oder linke) Hinterbein mit der Plantarfläche nach oben gerade nach hinten, fixiert den Schwanz zwischen 3. und 4. Finger der linken Hand und läßt sofort nach der Aufnahme das Tier wieder frei. Auf die Haltung des Beines ist sorgfältig zu achten, es soll damit die Fibula aus dem Aufnahmefeld der Tibia gerückt werden. Seit Einführung der neuen Röntgentechnik ist der beim früheren Aufspannverfahren stets beobachtete und als unvermeidlich angesehene Gewichtssturz nach der Aufnahme ausgeblieben. Nach einiger Einarbeitung kann man erreichen, daß jede Aufnahme gelingt. Als Aufnahmegerät hat sich der tragbare Metalixapparat sehr gut bewährt. (Belichtung bei offener Blende mit Fokus—Hautabstand 40 cm : 1,1 Sekunden, Zahnfilme 3 × 4.) Die Kennzeichnung der Filme geschieht durch Aufschreiben einer Nummer auf die Umhüllung, aber nach erfolgter Aufnahme, da Bleistift oder Kopierstift sich abzeichnet. Beim Entwickeln und Fixieren benutzt man Rähmchen, beim Trocknen Klammern mit den gleichen Nummern. Darauf wird der Film mit weißer Tusche beschrieben."

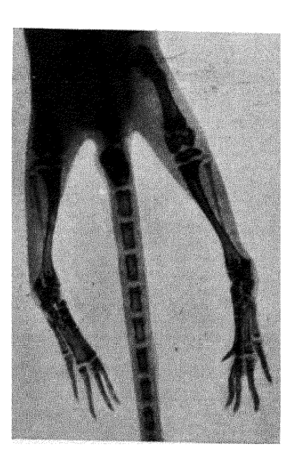


Abb. 49. Richtige Lage des Tieres beim Röntgen. (Nach Schultz.)

Die Messung des Metaphysenspalts

Die Messung des Metaphysenspalts kann mit einem Millimetermeßinstrument vor der Mattscheibe geschehen. Besser ist aber folgende Methode:

Die Röntgenaufnahme wird mittels eines Projektionsapparates auf einen Schirm geworfen. Hier befindet sich ein Maßstab in einer Gleitschiene, der zwei drehbare mit Zentimetereinteilung versehene Zeiger trägt. Die gefundene Zahl der Zentimeter der Tibiametaphyse dividiert durch die Vergrößerungszahl ergibt die Größe des Metaphysenspalts (Abb. 50).

2. Der Röntgenheilungstest nach **Bourdillon-Bruce-Webster** 42)

3—4 Wochen alte Ratten im Gewicht von 45—50 g erhalten 2 Wochen lang die rachitogene Kost von Steenbock. Sie werden nach Beendigung der Vorperiode geröntgt. Anschließend erhalten die geeigneten Tiere 2 Wochen lang täglich die zu prüfende Substanz bzw. ein Standardpräparat des Vitamins D. Nach Abschluß der Versuchsperiode wird ein zweites Röntgenbild angefertigt. Die Bewertung erfolgt durch Vergleich beider Bilder. Die Tiere entstammen am besten einer Zucht, die auf der oben von den Verfassern angegebenen „stock"-Diät gehalten wird. Die Jungen werden nach 3,5 Wochen von der Mutter entfernt und erhalten weiter die Zuchtkost, bis sie das vorgeschriebene Gewicht erreicht haben. Die Röntgenaufnahme soll in Narkose erfolgen, doch halten wir die Schultzsche Technik für besser, da in der Narkose immerhin 2 % der Tiere eingehen.

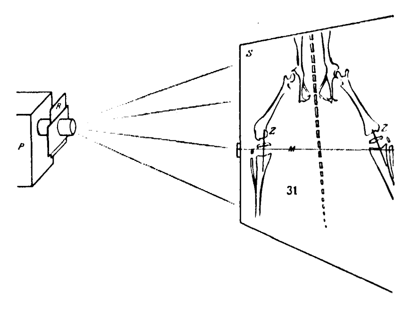


Abb. 50. Messung des Metaphysenspaltes. (Nach Schultz.)

Aussuchen der für den Heilungstest geeigneten Tiere: Am Ende der Vorperiode kann man die rachitischen Tiere auf Grund des Röntgenbefundes in 3 Gruppen teilen: 1. Tiere mit schwerer Rachitis, 2. Tiere mit leichter Rachitis und 3. Tiere mit erst beginnender Verkalkungsstörung (s. Abb. 51). Für den Testversuch können nur Tiere der ersten Gruppe Verwendung finden. Die zweite Gruppe sollte nur dann benutzt werden, wenn anderweitig nicht genügend Tiere zur Verfügung stehen. Die dritte Gruppe ist für jeden Versuch unbrauchbar. Bei leichter Rachitis ist die Beurteilung der Heilung schwierig, zumal auch die Unterschiede bei Tieren derselben Gruppe weit größer sind als bei der Gruppe 1.

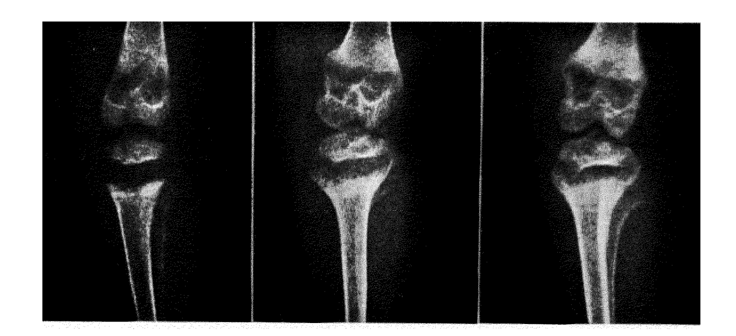


Abb. 51. Verschiedene Typen der unbehandelten Rachitis.

Links: Genügende Rachitis. Mitte: Milde Rachitis, genügt nur für den Vergleich mit einer Standardlösung. Rechts: Sehr milde Rachitis, für Testversuche unbrauchbar. (Nach Bourdillon.)

---

42) Bourdillon c. s., London His Majestys State Office 1931 "The quantitativ Estimation of Vitamin D by Radiography". Biochemic. J. 26, 506, 522 (1932).

Tabelle 34

Ratte	Dosis	Ratte	Dosis
a	1/7500 mg Standard	d	1/x mg zu untersuchende Substanz
b	1/15 000 „ „	e	1/2 x „ „ „ „
c	1/30 000 „ „	f	1/4 x „ „ „ „



Abb. 52. Heilungsskala rachitischer Ratten nach Bourdillon. Obere Reihe von links nach rechts Stadien 1—6, untere Reihe von links nach rechts Stadien 7—12.

Aufteilung der Tiere in Gruppen: Die Dosen werden derart verteilt, daß die Hälfte der Tiere eines jeden Wurfs das Standardpräparat, die andere Hälfte das zu prüfende Präparat erhält.

Wenn man z. B. 6 Ratten hat, verteilt man wie auf Tabelle 34 angegeben.

Dabei sind die Tiere a und d die beiden schwersten des Wurfs und die Tiere c und f die leichtesten. Die größeren Dosen werden den kleineren Tieren gegeben. Alle Dosen werden in 0,2 ccm Öl verabreicht. Die Beurteilung der Röntgenbilder nach Beendigung des Versuchs erfolgt an Hand einer Skala (Abb. 52).

Die Beschreibung lautet:

0 No trace of calcification. (Not reproduced in photograph.)
1 Trace of calcification visible, but not sufficient to form a line right across the new tissue. (Reproduktion has exaggerated the calcium in this photograph.)
2 Calcium deposited scantily in a rather narrow line nearly, or quite across the new tissue.

3 A broad band of lightly calcified tissue fillung up about half, or two thirds of the zone which had been uncalcified.
4 As 3, but calcium deposit more dense.
5 As 4, but density slightly increased and traces of commencening organization visible, especially at the edges of the deposit, which become sharper and less irregular.
6 Density and signs of organisation increased. Edges of new calcification well defined.
7 As 6, but with characteristics increased. New calcified zone now well joined to the old bone. Very little uncalcified tissue left.
8 Organization claerly marked, with signs of trabeculae visible, and sometimes some horizontal striations.
9 Further development of 8. Zone of demarcation between old bone and healed rachitic tissue becoming much less marked.
10 Little unorganized left tissue. Demarcation zone nearly disappeared. Upper edge of new bone still obviously blurred.
11 Nearly healthy bone, but slight blurring at the top edge of new bone and som gap between it and epiphysis.
12 Normal bone. Early healing shown by absence of perceptible swelling.

Die Auswertung geschieht nicht durch Bestimmung der Heilungsgrade für verschiedene Dosen, sondern um die Unterschiede in der Empfindlichkeit der Tiere zu verschiedenen Zeiten möglichst auszuschalten, aus der Differenz zwischen dem Standard und der unbekannten Substanz. Die Skala ist annähernd logarithmisch und die Veränderungen der Skalenwerte bei einer bestimmten Änderung der Dosis proportional der Veränderung im Logarithmus der Dosis. Verdoppelung oder Halbierung der Dosis vermehrt oder vermindert den Skalengrad um konstant 2.

Die Auswertung erfolgt durch Ermittlung der Skalenwerte der Standardtiere und derjenigen für die unbekannte Substanz. Daraus wird der Mittelwert berechnet. Beispiel:

Tabelle 35

Dosis	Skalenwert für Standard	Skalenwert für Unbekannt	Differenz
1/7500 mg.	8	6,5	—1,5
1/15 000 „	6,5	4,5	—2
1/30 000 „	3,5	2	—1,5
1/60 000 „	1	1	0
		Summe:	—5
		Mittel:	—1,25

Der Unterschied zwischen Standard und Unbekanntem beträgt also — 1,25 Skalenteile pro Rattenpaar. Aus nachstehender Tabelle 36 ergibt sich:

— 1,25 Skalenteile = Beziehung der Dosen wie 0,648 : 1.

Die unbekannte Lösung hat also = Standard · 0,648 E.

Man kann auch die Tabelle umgehen und die Werte aus der Gleichung

Beziehung der Dosen = anti log. (Skalendifferenz · 0,1505)

berechnen.

Fehler kommen bei der Handhabung der Methode vor. So z. B. durch unsymmetrische Heilung. Die hauptsächlichsten Fehlerquellen liegen aber in der Verschiedenheit der Ansprechbarkeit der Tiere und zweitens in der Stellung der Diagnose des Heilungsstadiums.

Tabelle 36

Heilungsdifferenz nach der Skala A—B	Beziehung d. Dosen A—B	Heilungsdifferenz nach der Skala A—B	Beziehung d. Dosen A—B
0,0	1,0	— 0,25	0,917
+ 0,25	1,09	— 0,5	0,841
+ 0,5	1,19	— 0,75	0,770
+ 0,75	1,30	— 1,0	0,707
+ 1,0	1,41	— 1,25	0,648
+ 1,25	1,54	— 1,5	0,594
+ 1,5	1,68	— 1,75	0,545
+ 1,75	1,83	— 2,0	0,500
+ 2,0	2,0	— 2,5	0,420
+ 2,5	2,38	— 3,0	0,354
+ 3,0	2,83	— 3,5	0,297
+ 3,5	3,36	— 4,0	0,250
+ 4,0	4,0	— 4,5	0,210
+ 4,5	4,76	— 5,0	0,177
+ 5,0	5,66	— 5,5	0,149
+ 5,5	6,72	— 6,0	0,125
+ 6,0	8,0	— 7,0	0,0884
+ 7,0	11,3	— 8,0	0,0625
+ 8,0	16,0	— 9,0	0,0442
+ 9,0	22,6		

Nach der von den Verfassern durchgeführten Fehlerrechnung ist der wahrscheinliche Fehler der Methode mit 20 Rattenpaaren etwa 8 %.

3. Der Röntgenheilungstest nach van Everse und Niekerk 43).

Junge Ratten erhalten die Kost 2965, bis sie schwere Rachitis zeigen. Diagnose durch Röntgenbefund. Diaphysenspalt etwa 1,8—2 mm. Tiere, die den Anforderungen genügen, werden nach den schon wiederholt beschriebenen Regeln in Gruppen eingeteilt und 14 Tage lang mit der zu prüfenden Substanz behandelt. Für jede Dosis nimmt man 10—15 Tiere. Die Röntgenaufnahme wird am 7., 10., und 14. Tage wiederholt. Der Röntgenbefund am rachitischen Tier wird mit 0, die Heilungsvorgänge graduiert mit 1—7 bezeichnet (7 = vollkommene Verkalkung, Stadium 1 entspricht etwa einem positiven Line-Test). Der Gesamtversuch ist für eine bestimmte Dosis positiv, wenn 80 % aller Tiere in 14 Tagen eine vollkommene Heilung zeigen. Nicht gewertet werden Tiere, die an Gewicht abnehmen (vgl. Abb. 53).

4. Der Röntgenheilungstest nach Poulsson und Lövenskjold 44).

Ratten aus einer Standardzucht (Kost: Brot, Mais, Milch 1 : 1 mit Wasser verdünnt, ad lib. dazu zweimal wöchentlich Gemüse, Karotten und gekochtes Fleisch) werden im Alter von 24 Tagen von der Mutter entfernt und mit einem Gewicht von 45—50 g auf die Steenbockkost 2965 gesetzt. Nach 25 Tagen wiegt man sie und röntgt ein Kniegelenk. Die versuchsreifen Tiere werden zu vieren in Käfige gesetzt, die Sägemehl enthalten, und 6 Tage lang mit der zu untersuchenden Substanz behandelt (bei Lebertran etwa 3 mg pro die). Nach Ablauf dieser Zeit werden die Ratten erneut gewogen und geröntgt. Tiere, die während der Versuchsperiode nicht gediehen, scheiden bei der Bewertung aus.

Durch Vergleich der Röntgenbilder rachitischer Ratten vor und nach der Behandlung kann ein Schluß auf die Wirksamkeit der verabreichten Substanzen gezogen werden.

43) van Everse c. s., Neederl. Tijdskr. Geneesk. 75, 1101 (1931).
44) Poulsson c. s., Biochemic. J. 22, 134 (1928).

Die Auswertung der ersten Röntgenbilder erfolgt durch +-Zeichen. Dabei bedeutet ++++ einen Metaphysenspalt von 4—5 mm Weite (Tibia), +++ einen solchen von 3—4 mm. Engere Metaphysen erhalten ++ und +. Wenn nicht ganz scharfe Grenzen vorhanden sind oder wenn ein enger Kalksaum eben über der Diaphyse liegt, wird die Rachitis um ein + weniger bewertet, also z. B. statt ++++ nur +++. Meist ist die Metaphyse rechtwinklig, bei leichter Rachitis mitunter auch ein stumpfeckiges Dreieck, dessen Basis die Fibula ist. Aus der Abbildung 54 sind Beispiele der verschiedenen Stadien ersichtlich.

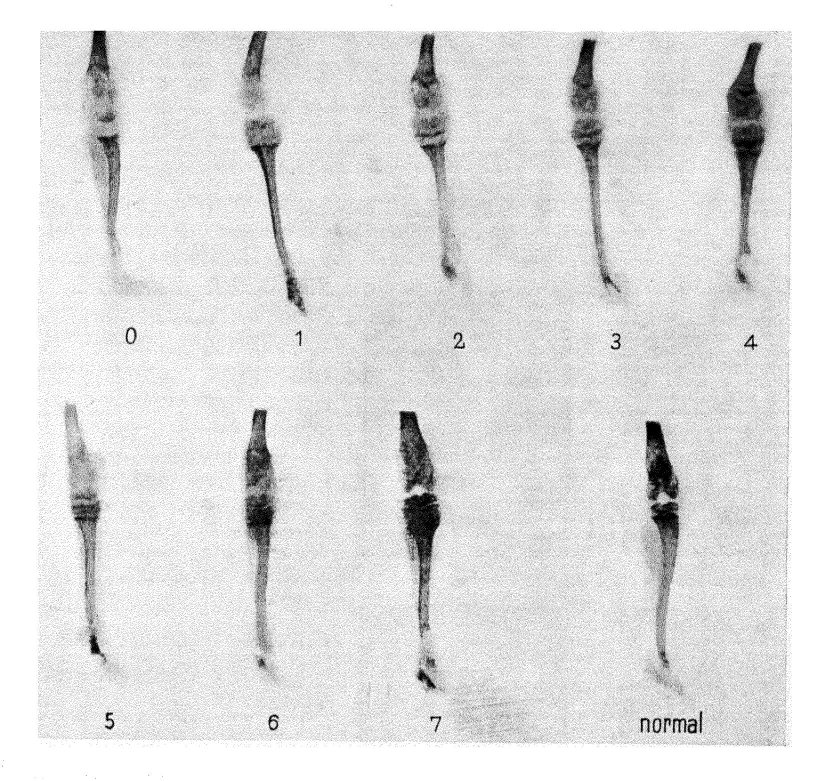


Abb. 53. Rachitisheilungsgrade. (Nach van Everse.)

In jeder Gruppe von 4 Tieren, die zum Heilversuch benutzt werden, müssen immer mindestens 2 eine Rachitis ++++ oder +++ zeigen.

Nach Beendigung der Heilperiode wird das zweite Röntgenbild mit dem ersten verglichen. Bei der Bewertung der Heilung bedeutet:

— eine Verschlimmerung der Rachitis,
+ — keine Veränderung der Rachitis gegenüber der ersten Aufnahme,
+ ++ +++ ++++ zunehmende Heilung.

Bei Beginn der Verkalkung zeigt sich zunächst in der Metaphyse ein leichter Schattenstrich, der durch eine unverkalkte Zone von der Epiphyse getrennt

Tabelle 37

Lot 225. Cod-liver oil 346. Daily dose 4 mg.

Rat No.	Rickets	Healing	Change in wt during the test period g.
1192	+++	++++	+ 14
1195	+++	+++	+ 10
1200	+++	++++	+ 7
1204	+++	+++	+ 9

Result. Very great antirachitic action, together with great gain of weight.
Conclusion. New test with a smaller dose, e.g. 2 mg.

Lot 296. Cod-liver oil 386. Daily dose 3 mg.

1860	+++	++	+ 5
1866	+++	+++	+ 4
1871	++	+++	+ 6
1880	+++	+++	+ 1

Conclusion. About 300 vitamin D units per g.

ist. Mitunter ist dieser Streifen in der Mitte unterbrochen. Bei Fortschreiten der Heilung wird der Streifen breiter und bei vollkommener Heilung zeigt die ganze Metaphyse Verkalkung. Ein Testbeispiel wird in vorstehender Tabelle gebracht.

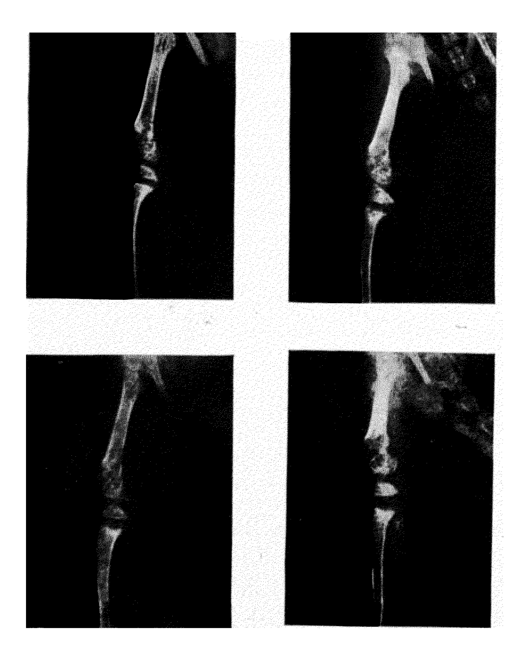


Abb. 54. Rachitisgrade. (Nach Poulsson.) Oben links + Rachitis, oben rechts ++ Rachitis, unten links +++ Rachitis, unten rechts ++++ Rachitis.

Eine Oslo-Einheit wird ausgedrückt durch beginnende Heilung in der kalkfreien Metaphyse.

Eine ähnliche Methode haben Beard-Thomas 44a) und Goldblatt bei ihren Vitamin D-Studien benutzt. Auch Knudson-Moore 44b) verwenden die Methode zusammen mit dem Line-Test.

c) Weitere kurative Methoden 45)

1. Der Wachstumstest auf Vitamin D.

Der Test beruht auf der Erscheinung, daß Ratten auf einer vollwertigen aber D-freien Kost nach einiger Zeit das Wachstum einstellen, bei Verabreichung D-haltiger Substanzen wieder an Gewicht zunehmen.

Junge, 30 g schwere Ratten werden zunächst wurfweise in Käfigen gehalten und mit einer Kost aus 15 % Casein, 73 % dex-

44a) Beard c. s., J. of biol. Chem. 96, 307 (1932).
44b) Knudson c. s., J. of biol. Chem. 81, 49 (1929).
45) Coward c. s., Biochemic. J. 26, 1585 (1932).

trinierter Reisstärke, 8 % Hefe und 4 % Steenbocksalz unter Zulage von Carotin ernährt. Carotindosis 0,04 mg in 0,02 ccm Olivenöl. Die Tiere wachsen gewöhnlich während der ersten Zeit normal. Einige nehmen zwar nicht erheblich zu, andere wieder zeigen Zunahmen von 20—30 g oder sogar von 60—70 g, bis sie das Wachstum einstellen. Ist nach mehrmaliger Wägung eine Gewichtszunahme nicht mehr festzustellen, setzt man die Ratten in Einzelkäfige und behandelt 5 Wochen lang mit der zu prüfenden Substanz. Unbrauchbar sind dabei solche Tiere, die zu Beginn der Versuchsperiode 100 g und mehr wiegen. Die Fütterungsperiode bis zum Eintritt des Gewichtsstillstandes kann 1—3 Monate (!) betragen. Ein Testbeispiel wird in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 38

	Dose of vitamin D units	No. of ♂ rats surviving 5 weeks	No. of ♂ rats dead in 5 weeks	Mean increase in wt. in 5 weeks g.	No. of ♀ rats surviving 5 weeks	No. of ♀ rats dead in 5 weeks	Mean increase in wt. in 5 weeks g.	Average increase *) g.
(a) 0,04 mg. carotene as source of vitamin A:								
A	0,01	0	0	—	2	1	11,0	11,0
A	0,05	5	2	42,4	5	0	39,8	41,1
A	0,1	5	2	70,8	6	0	37,5	54,15
A	0,2	5	0	83,6	5	1	52,0	67,8
A	0,25	1	1	75,0	2	0	54,5	64,75
A	0,4	5	0	78,4	6	0	63,1	70,75
A	0,75	1	1	88,0	1	0	51,0	69,5
A	0,8	4	0	84,75	5	2	54,8	69,77
A	10,0	2	0	84,0	1	0	57,0	70,5
B	0,00001 mg. I.E. (=0,02 unit)	1	0	38,0	6	0	20,2	29,1
B	0,0005 mg. I.E. (=1,0 unit)	5	0	104,2	6	0	53,3	78,75
(b) 0,04 mg. light petroleum-soluble fraction of dried carrot as source of vitamin A:								
C	No dose	4	3	17,25	3	5	0	8,625
C	0,01	6	1	3,1	2	0	5,5	4,3
C	0,02	5	1	9,8	7	0	5,7	7,75
C	0,05	6	0	10,7	4	1	14,5	12,6
C	0,1	7	1	15,0	7	2	24,6	19,8
C	0,5	7	1	41,4	2	1	40,5	40,95
C	1,0	6	1	36,0	3	0	36,7	36,35

Dose of solution of I.E. mg.	No. of ♂ rats on test	Mean increase in wt. in 5 weeks g.	Dose of standard which would have brought about this increase, units	Dose of standard equiv. to 1 g. units	No. of ♀ rats on test	Mean increase in wt. in 5 weeks g.	Dose of standard which would have brought about this increase, units	Dose of standard equiv. to 1 g. units
0,00001	1	38	0,0149	1,490,000	6	20,2	0,0129	1,290,000
0.0005	5	104	2,3572	4,714,400	6	53,3	0,3692	738,400

The weighted mean of the values found from the bucks and does respectively on the two doses is 2,068,500 units per g. which is near to the estimation made by the line test.

*) This is the simple average of the values obtained from the bucks and does in each group. It seemed unsound to calculate the weighted means in the tests where large doses of vitamin D were given and the bucks made much greater increases in weight than the does.

Die Berechnung der Ergebnisse kann entweder aus dem Diagramm erfolgen oder aber nach einer der beiden Gleichungen:

$$y = 92,82 + 30,02 \cdot \log x \text{ (für männliche Tiere)},$$
$$y = 63,14 + 22,74 \cdot \log x \text{ (für weibliche Tiere)},$$

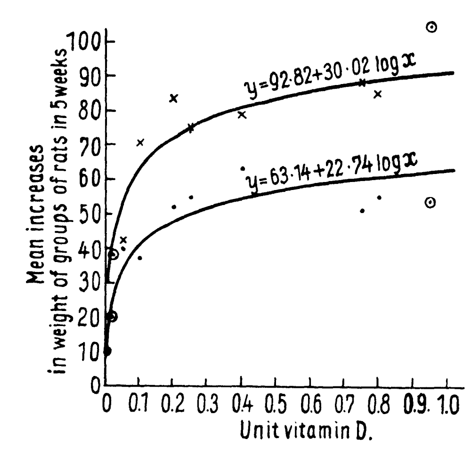


Abb. 55. Gewichtskurven von Ratten auf D-freier aber mineralausbalanzierter Kost. Wachstum nach Zulage des internationalen D-Standards.

× männliche, ⊙ weibliche Tiere. • Mittelwerte von beiden. (Nach Coward.)

wo y die durchschnittliche Gewichtszunahme der Tiere im Fünfwochenversuch und x die Dosis an Vitamin D in Einheiten darstellt.

Der Wachstumstest dauert erheblich länger als einer der anderen Methoden, ist aber mindestens ebenso genau wie der Line-Test. Um die Fehlergrenzen nach Möglichkeit zu reduzieren, ist es nötig, für den Wachstumstest doppelt soviel männliche Tiere zu nehmen als weibliche, da die männlichen Tiere stärkere Schwankungsbreiten zeigen.

Auch Sherman-Stiebeling 46) konnten zeigen, daß Ratten, die auf einer vollständigen, aber D-freien Diät gehalten werden, im Wachstum behindert sind. Zugabe von Vitamin D beeinflußte, je nach der Dosis, das Wachstum mehr oder weniger. Die Tiere für den Wachstumstest dürfen nicht zu große D-Reserven haben, da dann der Test sich nicht durchführen läßt. Am besten sind Tiere, die aus einer Zucht stammen, die auf der Steenbockzuchtdiät gehalten wurden, da sie zwar große A-Reserven, aber wenig D gespeichert haben. Tiere auf der Shermanzuchtdiät B haben zuviel Vitamin D gespeichert, als daß sie für den Wachstumstest brauchbar wären. Weitere Angaben über Vitamin D und Wachstum finden sich öfter in der Literatur. Crawford-Golding-Perry und Zilva bestimmen im Butterfett das Vitamin D nach dem Wachstumstest von Soames und Leigh-Clare 47).

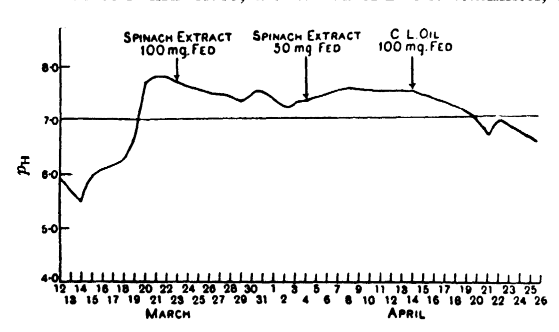


Abb. 56. Wirkung der Fütterung von Spinatextrakt auf den Faezes-p_H bei rachitogen ernährten Ratten auf der fettarmen Zuckers Diät. (Nach Willimot.)

Die Grundkost besteht aus 43,7 g Weizenstärke, 14,3 g Casein, 12,4 g gehärtetem Baumwollsamenöl, 8 g Hefe, 5 g Salzgemisch, 5 ccm Zitronensaft und 20 g Weizenkeime unter Zugabe von Wasser. Die Milch wird nicht als solche ver-

---

46) Sherman c. s., J. of biol. Chem. 88, 687 (1930); 83, 497 (1929).
47) Leigh c. s., Lancet 1, 150 (1928); Biochemic. J. 22, 522 (1928).

abreicht, sondern als Gemisch folgendermaßen: 79 g Stärke, 21 g Baumwollsamenöl, 14 g Hefe, 9 g Salz, 9 ccm Zitronensaft, 36 g Weizenkeime, 125 g Trockenmilch. Zunächst wird eine bestimmte Menge dieses Gemisches verfüttert, dann erhalten die Tiere die Grunddiät ad libitum. Die Autoren fanden die Minimaldosis für Wachstum erst in einer 0,68 g Butter entsprechenden Menge. Die Versuche scheinen durch die nicht völlige Vitaminfreiheit der Grundkost beeinflußt zu sein.

2. Der Fäzes-p_H-Test auf Vitamin D 48).

Die Beobachtung, daß bei rachitischen Kindern und Tieren der p_H im Darm nach der alkalischen Seite verschoben ist und bei der Heilung der Rachitis zur sauren Seite umschlägt, kann als Test auf D-Wirksamkeit gelten. Nach der Methode von Bacharach-Jephcott, die allerdings nicht ohne Widerspruch geblieben ist, kann die Bestimmung schnell und mit genügender Genauigkeit erfolgen. Der Test ist allerdings nur für solche Substanzen brauchbar, in denen das Vitamin D schon in konzentrierter Form vorliegt, da die Verabreichung größerer Futtermengen schon allein genügt, den p_H des Darmes zu verschieben. Die zu prüfenden Substanzen müssen ölige Lösungen sein.

Nach Willomot-Wokes ist es ohne Belang, ob die rachitogene Kost Fett enthält oder nicht. Sie erzielten mit der Kost von Zucker und Barnett (Nr. 22) gute Ergebnisse. Man setzt nach Jephcott c. s. 4 Tiere auf eine rachitogene Diät, mischt die Fäzes und bestimmt den p_H. Ist der Wert auf über 7 angestiegen, werden die Ratten in zwei Gruppen geteilt, von denen die eine das zu prüfende Präparat, die andere einen Standardtran erhält. Gewöhnlich kann mit der Auswertung schon nach 10 Tagen begonnen werden, da dann schon der p_H auf 7—8 angestiegen ist. Ein Auswertungsbeispiel zeigt vorstehende Abb. 56 nach Willomot c. s. (Extrakt aus Spinat). Wie ersichtlich, gelingt es durch Zugabe des Extraktes nicht, den p_H zu drücken, was aber nach Lebertranverabreichung der Fall ist 49).

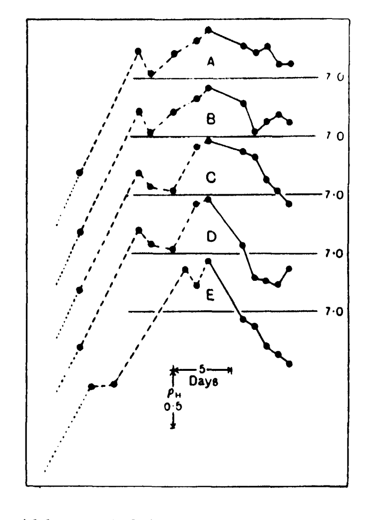


Abb. 57. Wirkung der Fütterung des Präparats Osteolin auf den Faezes-p_H rachitischer Ratten. A = 0,013 mg Osteolin in 22,5 mg Olivenöl, B = 0,026 mg in 45 mg Öl, C = 0,039 mg in 67,5 mg Öl, D = 0,053 mg in 90 mg Öl, E = 0,066 mg in 22,5 mg Olivenöl. Punktierte Linie: Rachitogene Kost ohne Bestimmung des p_H. Gestrichelte Linie: Rachitogene Kost mit Bestimmung des p_H. Ausgezogene Linie: Rachitogene Kost + Präparat. (Nach Jephcott.)

Ein Beispiel nach Jephcott c. s. sei ebenfalls angegeben. Auswertung des Präparats Osteolin:

20—40 Tage alte Ratten im Gewicht von 40—60 g erhalten entweder die rachitogene Zucker-Diät (Nr. 22, nach Z. Bezeichnung 401) oder die Sherman-Kost Nr. 84. Morgens werden die Fäzes gesammelt, wobei die mit Urin verunreinigten verworfen werden. Man wiegt den Kot in einem Wägegläschen ab, verdünnt mit Wasser auf eine etwa 0,02 %ige Lösung, mischt gut und filtriert durch Watte oder Glaswolle. Der p_H der Lösung wird elektrometrisch

48) Jephcott-Bacharach, Biochemic. J. 22, 60 (1928); 20, 1351 (1926); Lancet 1, 261 (1928); J. of biol. Chem. 82, 721 (1929).

49) Willimot c. s., Biochemic. J. 21, 887 (1927); 22, 15 (1928).

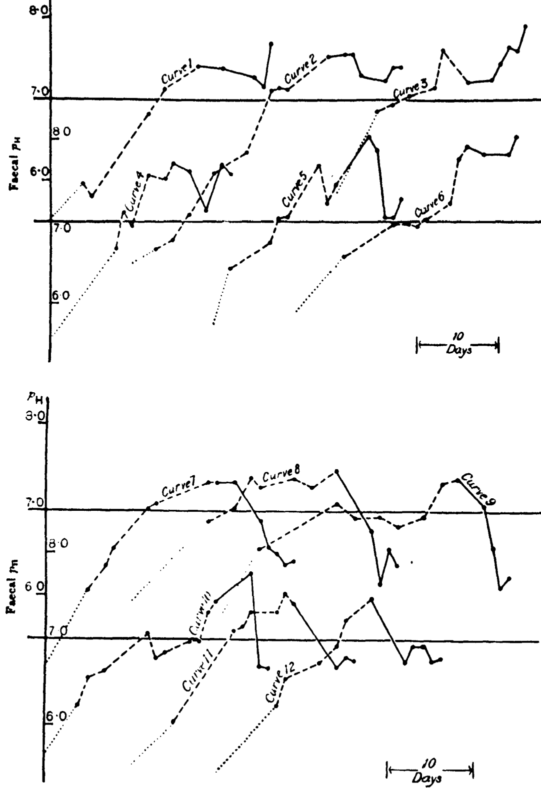


Abb. 58. P_H-Änderung der Fäzes rachitischer Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen. (Strichelung der Kurven siehe Abb. 57.)

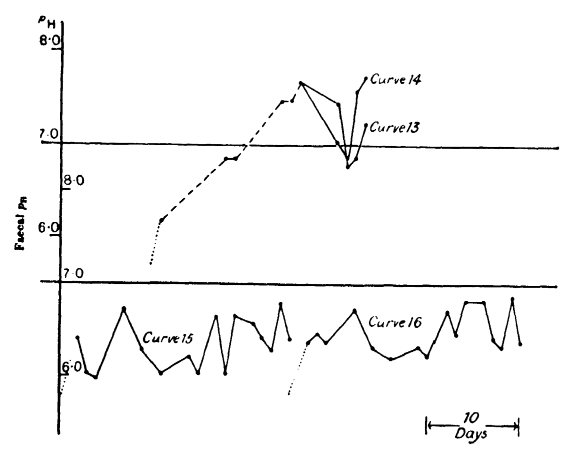


Abb. 59. Fäzes p_H rachitischer Ratten. (Siehe Abb. 57 und 58.)

bestimmt. Die Untersuchung geschieht zunächst alle 3—4 Tage. Nach 10 bis 12 Tagen sind die Fäzes meist alkalisch, dann untersucht man täglich, bis zwei aufeinanderfolgende Bestimmungen im Durchschnitt einen Wert von über 7,3 geben, wobei die Werte nie unter 7,2 sinken sollen.

Die versuchsreifen Tiere erhalten eine Dosis des zu untersuchenden Präparats. Drei Tage später wird erneut der Fäzes-p_H bestimmt. Die Untersuchung erfolgt von da ab täglich, bis zwei aufeinanderfolgende Bestimmungen einen Wert von 6,7 oder weniger, aber nicht mehr als 6,8 ergeben.

Man bezeichnet diejenige Vitaminmenge, die imstande ist, diese Werte hervorzurufen, mit 1 E. Neuerdings wird der Wert auf 10 E. festgelegt. 1 g eines guten Lebertrans soll 100 solcher Einheiten enthalten.

Die Abb. 57, 58 und 59 zeigen zunächst den Anstieg des p_H der Fäzes auf der rachitogenen Kost, weiter den Abfall des p_H nach Behandlung mit Vitamin D. Schließlich ist in der Abbildung die Heilung der Rachitis durch UV.-Bestrahlung, die ebenfalls mit einem Sinken des p_H einhergeht, ersichtlich. Auch die Verhütung der Rachitis durch UV-Betrahlung geht aus der Abbildung hervor.

Erläuterungen zu den Abbildungen 58 und 59

Daily supplementary treatment	Basal diet	No. of animals	Day of beginning supplementary treatment	Curve
Abb. 58 oben				
0,04 cc. paraffinum liquidum, B. P.	401	2♀	18	1
0,025 cc. glycerol	84	2♂, 1♀	24	2
0,025 cc. glycerol	84	2♂	16	3
>0,001 g. recryst. cholesterol, in 0,02 cc. olive oil .	401	2♀	15	4
>0,001 g. crude cholesterol from cod-liver oil, in 0,02 cc. olive oil	401	2♀	15	5
>0,0015 g. crude cholesterol from cod-liver oil, in 0,02 cc. olive oil	401	2♀	22	6
Abb. 58 unten				
0,10 cc. cod-liver oil	401	1♂, 1♀	20	7
0,002 g. cholesterol, irradiated 1 hour, in 0,08 cc.	401	2♂	24	8
0,001 g. cholesterol, irradiated 2 hours, in 0,04 cc.	401	2♂	28	9
0,0005 g. cholesterol, irradiatet 3 hours, in 0,02 cc.	401	2♀	20	10
0,00013 g. cholesterol, irradiated $4^1/_2$ hours, in 0,08 cc.	401	2♂	19	11
0,002 g. cholesterol, irradiated 12 hours, in 0,08 cc.	401	2♀	18	12

All cholesterol was irradiated at $7^1/_2$ inches from an open tungsten arc, and then dissolved in olive oil.

Daily supplementary treatment	Basal diet	No. of animals	Day of beginning supplementary treatment	Curve
Abb. 59				
Animals irradiated 30 minutes at 2 feet	401	2♀	16	13
Animals irradiated 15 minutes at 2 feet	401	2♀	16	14
Animals irradiated 30 minutes at 2 feet	401	1♂, 1♀	0	15
Animals irradiated 15 minutes at 2 feet	401	1♂, 1♀	0	16

d) Die prophylaktischen Röntgenmethoden zur D-Bestimmung

1. Die prophylaktische Röntgenmethode von Bourdillon und Bruce 50)

Ratten im Alter von 21—28 Tagen, mit einem Gewicht von 40—45 g erhalten in Einzelkäfigen die Kost Nr. 3143 nach McCollum und 28—33 Tage lang dazu eine Lösung der zu untersuchenden Substanz.

In jedem Wurf läuft ein Tier als unbehandelte, negative Kontrolle mit, ein anderes erhält eine bestimmte Menge einer schon ausgewerteten Lösung des Vitamins D als positive Kontrolle.

Die Tiere werden nach Beendigung des Versuchs getötet und geröntgt. Die Auswertung der Bilder erfolgt an Hand nachfolgender Abbildungen. Die verschiedenen Stadien werden mit Nummern von 1—8 versehen.

Eine Beschreibung der Bilder geht aus folgendem hervor:

Scale No. 8. Healthy bone, with no appreciable blurring of the top of the metaphysis.

Scale No. 7. Definite blurring at top of metaphysis, but only for a very short length.

Scale No. 6. Top of metaphysis blurred for appreciable distance (usually a small gap of uncalcified tissue between shaft and epiphysis).

---

50) Bourdillon-Bruce, Biochemic. J. 26, 506 (1932).

Scale No. 5. Blurring extends to 1 mm. or more, and the bone has no definite edge to it. In some specimens the blurred area is less deep, but there is a very narrow gap of uncalcified tissue across the bone.

Scale No. 4. Definite narrow gap of uncalcified tissue right across the bone.



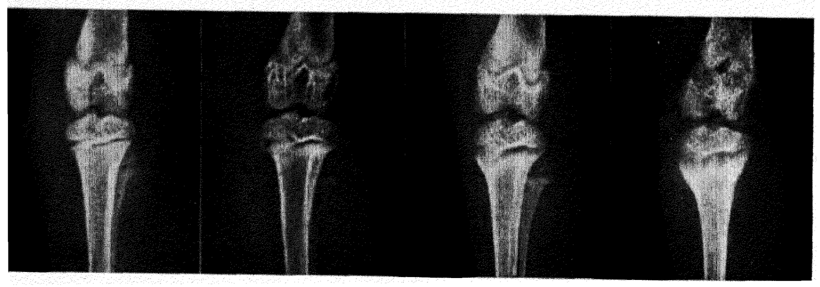


Abb. 60. Stadien der Rachitis im prophylaktischen Röntgentest.
Unten von links nach rechts Stadien 8, 7, 6, 5; oben von links nach rechts Stadien 4, 3, 2 und 1. (Nach Bourdillon).

Scale No. 3. Uncalcified zone about 1 mm. wide.

Scale Nr. 2. Uncalcified zone wider, but still traces of calcification at lowest portion of new tissue.

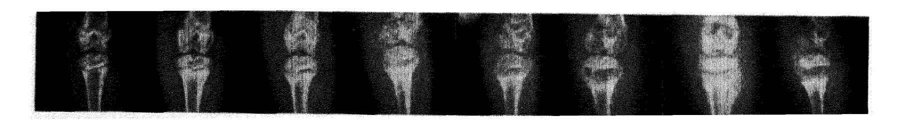


Abb. 61. Stadien der Rachitis im prophylaktischen Test.
Von links nach rechts Stadien 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 und 1. (Nach Bourdillon.)

Scale No. 1. Full rickets. Gap 1,5 mm. or more, without visible calcification.

Als Beispiel sei ein Versuch mit bekannten steigenden Dosen eines D-Präparats angeführt:

Tabelle 39. Radiographic scale readings of rats' knee-joints after prophylactic dosing

Litter-No.	Dose (in International Units) 0	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2	0,32	0,64	1,28	Mean ash percentage for each litter for doses 0 to 0,32 only
	Scale readings									
1867	1	3	1	1	3,5	5	5	—	—	31,36
1869	2,5	4	2,5	2,5	3,5	5,5	7	—	—	35,66
1828	4	4	4	6,5	6	6	8	—	—	37,01
2057	2	1	3	5	5	6	8	7,5	7,5	37,26
1834	5	5,5	4,5	5,5	6	7	7	—	—	38,39
2060	2	1,5	5	5	5	7	8	8	8	38,87
1827	5	4	7	5	6	6	8	—	—	38,97
Mean of 7 lowest litters	3,07	3,29	3,86	4,36	5,0	6,07	7,29	—	—	36,79
1854	2	4	4	5	6	7	6	—	—	39,76
1875	2	5	5	5,5	5,5	8	6	—	—	40,53
1914	5	5	5	5,5	6	6	7	8	8	41,84
1826	5	4	5,5	5	6	6	8	—	—	41,97
2095	1	2	3,5	4	4	5,5	6,5	8	7	42,14
1991	4	5	6	5,5	5	5,5	7,5	7,5	7,5	42,74
1915	4	7	4,5	5	6	7	6	7	7,5	43,01
1917	5	4	4	5,5	6	6	8	7	7,5	43,11
1988	3	5	6	5	5	5,5	7	6,5	7	43,13
1965	5	5	6	5	6	5,5	7	8	8	43,56
1943	5	5	5	4,5	5	6	7	8	7,5	44,06
1963	5	5	5	5	6	8	8	8	8	44,66
1954	5	5	6	6	7,5	7	7	8	7	48,61
Mean of 7 highest litters	4,57	5,14	5,21	5,14	5,93	6,45	7,14	7,5	7,5	44,31
Mean for all litters	3,62	4,2	4,62	4,85	5,42	6,27	7,1	7,62	7,54	40,83

Hat man einmal an Hand der Röntgenaufnahmen die Bewertungen der einzelnen Versuche nach obiger Skala durchgeführt, kann man die Wirksamkeit der verabreichten Dosis an folgender Kurve (Abb. 62, S. 124) ablesen.

Wie ersichtlich, sind hier Unterschiede gemacht zwischen mehr oder minder resistenten Würfen. Ein solcher Unterschied kann z. B. auch durch Ausführung einer Knochenanalyse gefunden werden. Auf diese Weise kann man die Auswertungen je nach der einen oder anderen Kurve vornehmen und kommt zu genaueren Ergebnissen. Wie aus der Kurvenabbildung ersichtlich, ist eine solche Komplizierung der Auswertung für Dosen über 0,05 E. durchaus unnötig, da die Kurven von diesem Wert ab nur geringe Abweichungen zeigen. Es ist also zweckmäßig, die Methode nur für Dosen über 0,05 E. zu gebrauchen und dabei stets in jedem Wurf ein Tier mit einer der Testdosis etwa entsprechenden Dosis eines bekannten D-Präparats zu behandeln. Kleine Unterschiede in der Prophylaxewirkung können dann an Hand der Kurve leicht ermittelt werden. (Die in der Tabelle gebrauchte Dosis ist die internationale.)

Für die Praxis kann man die Ablesungsmittelwerte der Skala für die Standardtiere und die Skalenmittelwerte der Tiere mit einer bestimmten Dosis der Testsubstanz an der Kurve als Logarithmen ablesen. Dann entspricht der Antilogarithmus

der Differenz der Logarithmen dem Wirkungsverhältnis zwischen Standard und unbekannter Lösung.

Die Verteilung der Tiere eines Wurfs erfolgt, wie bei allen Testmethoden, derart, daß ein Tier unbehandelt bleibt, ein Tier die Standardsubstanz erhält und die anderen steigende Dosen des zu untersuchenden Präparats. Die Tiere werden in den anderen Würfen ebenso verteilt. Die Empfindlichkeit der Methode erhellt daraus, daß ein Ablesefehler von + 0,5 Skalenteilen den Logarithmus der Wirkung der Dosis um 0,24 erhöht.

2. Die prophylaktische Röntgenmethode von Holtz-Laquer-Kreitmair-Moll 51).

Junge Ratten aus eigener Zucht (bestimmte Kost s. oben) werden im Alter von 4—6 Wochen mit einem Gewicht von 33—45 g in den Versuch genommen, und zwar werden sie in Serien zu je 10—12 Tieren eingeteilt, indem in jeder Serie mindestens ein Tier aus jedem Wurf vertreten sein soll. Die erste Serie dient als Kontrolle, die anderen erhalten abgestufte Mengen des zu untersuchenden Präparats. Die Verabreichung der Präparate geschieht mit der Pipette.

Als rachitogene Diät wird die McCollumsche 3143 verabreicht. Die Tiere erhalten im ganzen 14mal morgens vor der Fütterung das Präparat. Die Sonntagsdosis kann am Sonnabend nachmittag verabreicht werden. Die Tiere werden fortlaufend gewogen und dann am 14. Tage geröntgt. Das Röntgen geschieht entweder in Narkose oder durch Aufspannen auf ein Brett (s. Methodik von Schultz, oben). Die Aufnahmen werden jeweils unter genau denselben Bedingungen gemacht.

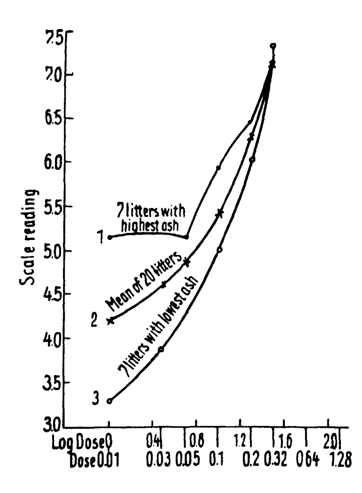


Abb. 62. Beziehung zwischen Prophylaxewirkung und Dosis im Röntgentest.

(Ordinate = Heilungsgrade der Bourdillonskala).
(Nach Bourdillon.)

Die Diagnose wird durch Zeichen ausgedrückt, und zwar bedeutet:

+ Rachitis,
— keine Rachitis (geschützt),
? zweifelhaft *).

Die negativen Kontrollen müssen starke Rachitis aufweisen. Der Epiphysenspalt muß mindestens 1 mm breit sein. Geschützt ist ein Tier, wenn keine Unterschiede gegenüber Normal vorhanden sind, wenn alle Knorpel-Knochengrenzen gut verkalkt sind. Der Epiphysenspalt ist entweder eine haarfeine Linie oder ein scharfbegrenzter Strich mit völlig parallelen, im Negativ hellen Rändern.

*) Hier soll bemerkt werden, daß obige Bezeichnungen + bzw. — früher von Holtz und Windaus 51a) in umgekehrtem Sinne gebraucht wurden, was beim Studium der betreffenden Arbeiten zu beachten ist.

51) Holtz-Laquer-Kreitmar-Moll, Biochem. Z. 1931, 237, 247.

51a) Windaus-Holtz, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 1927, H. 2.

Wichtig bei der Beurteilung ist die Gewichtszunahme der Tiere! Wenn positiv reagierende Tiere während der Versuchsperiode an Gewicht abnehmen oder nicht zunehmen, werden sie von der Auswertung ausgeschlossen, da sie in der Regel keine oder nur wenig von der Norm abweichende Knochenveränderungen zeigen. Gewöhnlich nehmen Tiere während des Versuchs etwa 10 bis 15 g zu. Tiere, die weniger als 5 g zunehmen, werden nicht gewertet. Zeigt die Mehrzahl der Tiere schlechtes Gedeihen, so kann man der McCollum-Kost etwas Milch (Vitamin A) zugeben, was die Auswertung nicht stört.

Bei Dosierung in geometrischer Reihe wie 0,025, 0,5, 0,1 γ hat die Methode einen Fehler von 50 %. Die Fehlerbreite kann aber noch unter $\pm$ 25 % liegen.

Die Einheit ist diejenige Tagesdosis pro Tier eines Präparats, die bei 14maliger, täglicher Verabreichung an Ratten mit dem Anfangsgewicht 33 bis 45 g, welche mit der Kost Nr. 3143 von McCollum gefüttert werden, 80 % oder mindestens 8 von 10 Tieren vor der durch Röntgenaufnahme festzustellenden Rachitis vollkommen schützt, während eine kleinere Dosis diese Bedingungen nicht mehr erfüllt. Besonderer Wert wird dabei auf das gute Gedeihen der Tiere gelegt, indem gefordert wird, daß alle ausgewerteten Ratten während des Versuchs mindestens 5 g zunehmen müssen.

Ein Auswertungsbeispiel nach Laquer geht aus folgenden Tabellen 40 bis 43 (S. 126ff.) hervor:

Die prophylaktische Einheit in der Definition von Laquer und Mitarbeitern ist gleich 5—6 internationalen oder MRC.-Einheiten oder gleich 6—8 Oslo-Poulssen-Einheiten. 100 Einheiten nach Laquer entsprechen einer klinischen Einheit.

3. Der prophylaktische Röntgentest von Scheunert und Schieblich 52).

Junge Ratten im Gewicht von 33—42 g mit einem Alter von 3—4 Wochen werden in Glashäfen gehalten (Bodenfläche 15 × 20, Höhe 18 cm), die einen Drahtnetzboden zur Verhütung der Koprophagie besitzen. Der Boden des Gefäßes wird mit Sägemehl bedeckt. Die Tiere werden mit der McCollum-Kost 3143 gefüttert, die in Kuchenform verabreicht wird. Ein Würfel von 20 g ist für ein Tier pro Tag ausreichend. Wasser wird in Trinkgefäßen gegeben. Die Haltung der Tiere geschieht wie bei Rachitisversuchen üblich.

Man nimmt für jede zu untersuchende Dosis 10 Tiere, indem die Würfe auf die verschiedenen Gruppen aufgeteilt werden. Man achtet darauf, daß Geschwistertiere möglichst nicht in dieselbe Gruppe kommen. Die Verabreichung der Dosis geschieht wie oben. Kontrolltiere erhalten das Lösungsmittel ohne Substanz.

Für jede Ratte wird eine besondere Gewichtskurve geführt, auf der Geschlecht, Wurfgröße und Abstammung sowie Alter zu Beginn mitverzeichnet werden. Nach 14tägiger Fütterung werden die Tiere getötet und geröntgt. Man verwendet am besten den Röntgenfilm. Die Bilder werden vor einer lichtstarken Lampe betrachtet. Die Beurteilung geschieht auf Grund der Befunde des proximalen Tibiaendes. Man bezeichnet mit — Fälle, die vollkommen normal sind, bei denen die Dosis also vollkommen Schutz gewährte. Deutliche Rachitis erhält je nach dem Grad die Bezeichnungen +, ++, +++. Fragliche Fälle werden mit ? gewertet.

52) Scheunert-Schieblich, Biochem. Z. 209, 299 (1929).

Tabelle 40

Vitamin D-Kontrollpräparat. Protokoll Nr. 1160. Kontrollen

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.
Geschlecht:	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.
Nr. des Wurfes:	2440	2942	3190	2937	2050	3380	1725	3408	3028	2555
Anfangsgewicht . . .	40	36	36	37	40	35	35	41	38	38
Endgewicht.	57	37	58	59	62	42	51	48	53	56
Gewichtsunterschied .	+17	+ 1	+22	+22	+22	+ 7	+16	+ 7	+15	+18
Diagnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Dosis 0,09 γ

Nr.:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bezeichnung:	schw.	w.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.	schw.	w.
Geschlecht:	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	1725	3408	3408	2028	1725	3028	3408	2555	3028	2555
Anfangsgewicht . . .	36	36	37	38	35	36	38	37	36	35
Endgewicht.	59	45	46	53	45	49	57	55	51	46
Gewichtsunterschied .	+23	+ 9	+ 9	+15	+10	+13	+19	+18	+15	+11
Diagnose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dosis 0,08 γ

Nr.:	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.	schw.	w.
Geschlecht:	männl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	2263	3537	1725	3408	2263	3527	1725	3408	3028	2555
Anfangsgewicht . . .	37	36	42	36	34	39	35	37	34	36
Endgewicht.	58	56	47	58	51	39	47	52	47	58
Gewichtsunterschied .	+21	+20	+ 5	+22	+17	(0)	+12	+15	+13	+22
Diagnose	—	—	—	—	—	(—)	—	—	—	—

Zeichenerklärung: schw. = schwarz, w. = weiß, w. l. = weiß linkes, w. r. = weiß rechtes Ohr gestutzt, weibl. = weiblich, männl. = männlich

Dosis 0,07 γ

Nr.:	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	männl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	männl.	männl.
Nr. des Wurfes:	2050	3380	2263	3537	2050	3380	2236	3537	2942	2440
Anfangsgewicht . . .	42	40	36	36	38	40	36	38	40	38
Endgewicht.	52	46	41	49	43	57	46	58	57	64
Gewichtsunterschied .	+10	+ 6	+ 5	+13	+ 5	+17	+10	+20	+17	+26
Diagnose	—	—	—	?	—	?	—	—	—	+

Dosis 0,06 γ

Nr.:	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.
Geschlecht:	männl.	weibl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.
Nr. des Wurfes:	2050	3380	2440	2942	3190	2937	3380	1725	3408	2555
Anfangsgewicht . . .	38	39	35	37	36	36	34	38	39	41
Endgewicht.	54	53	50	45	54	49	41	40	44	52
Gewichtsunterschied .	+16	+14	+15	+ 8	+18	+13	+ 7	(+ 2)	+ 5	+11
Diagnose	+	+	+	—	+	?	—	(—)	—	—

Tabelle 41

Vitamin D-Präparat. Protokoll Nr. 1143. Kontrollen

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.	schw.	w.
Geschlecht:	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	2988	2657	1010	2737	2655	3305	2213	3090	2860	2558
Anfangsgewicht . . .	36	42	37	42	33	34	36	34	36	34
Endgewicht.	45	40	49	57	48	42	54	48	56	50
Gewichtsunterschied .	+ 9	— 2	+12	+15	+15	+ 8	+18	+14	+20	+16
Diagnose	+	—!	+	+	+	+	+	+	+	+

Dosis 0,05 γ

Nr.:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.
Geschlecht:	männl.	männl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	männl.
Nr. des Wurfes:	864	3237	2259	2737	3305	2213	3090	2558	2988	2657
Anfangsgewicht . . .	41	32	34	34	37	35	41	34	33	37
Endgewicht.	55	40	39	40	58	42	55	42	44	48
Gewichtsunterschied .	+14	+ 8	+ 5	+ 6	+21	+ 7	+14	+ 8	+11	+11
Diagnose	—	—	—	—	?	—	—	—	—	—

Dosis 0,02 γ

Nr.:	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	männl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	2558	864	2558	3237	2860	3090	2213	3305	2558	864
Anfangsgewicht . . .	35	39	34	40	41	34	37	42	38	41
Endgewicht.	47	60	48	57	64	52	55	66	62	60
Gewichtsunterschied .	+12	+21	+14	+17	+23	+18	+18	+24	+24	+19
Diagnose	—	—	?	?	?	—	+	+	?	+

Dosis 0,01 γ

Nr.:	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.
Geschlecht:	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	männl.	männl.	männl.	männl.
Nr. des Wurfes:	2860	2558	2860	864	3090	3305	2737	2259	3237	2860
Anfangsgewicht . . .	37	34	34	37	38	34	38	42	35	37
Endgewicht.	61	47	50	57	53	54	51	57	56	45
Gewichtsunterschied .	+24	+13	+16	+20	+15	+20	+13	+15	+21	+ 8
Diagnose	+	?	+	+	—	+	+	?	?	—

Dosis 0,005 γ

Nr.:	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	schw.	w.
Geschlecht:	männl.	weibl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.
Nr. des Wurfes:	2213	3090	2213	3090	2860	2558	2259	3237	2860	864
Anfangsgewicht . . .	37	37	35	35	34	34	34	36	34	37
Endgewicht.	53	57	52	48	45	54	48	62	48	58
Gewichtsunterschied .	+16	+20	+17	+13	+11	+20	+14	+26	+14	+21
Diagnose	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+

Tabelle 42

Vitamin D-Präparat. Protokoll Nr. 1155. Kontrollen

Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bezeichnung:	schw.	w.	w. l.	w. r.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	männl.	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	männl.	männl.
Nr. des Wurfes:	3359	3124	3156	3101	2455	1923	2715	2062	1135	3297
Anfangsgewicht . . .	36	36	34	40	36	42	38	37	38	40
Endgewicht.	50	52	50	60	49	50	50	52	58	64
Gewichtsunterschied .	+14	+16	+16	+20	+13	+ 8	+12	+15	+20	+24
Diagnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Dosis 0,05 γ

Nr.:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	weibl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.
Nr. des Wurfes:	3359	3156	2938	3101	2715	2062	1135	3124	3156	3101
Anfangsgewicht . . .	38	39	37	34	36	40	37	34	33	36
Endgewicht.	54	60	48	47	52	61	54	48	43	58
Gewichtsunterschied .	+16	+21	+11	+13	+16	+21	+17	+14	+10	+22
Diagnose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dosis 0,03 γ

Nr.:	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	männl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.	männl.
Nr. des Wurfes:	1507	2134	3359	3101	1923	3297	1135	2062	2715	3359
Anfangsgewicht . . .	41	41	41	40	41	36	40	35	38	37
Endgewicht.	64	63	58	55	76	50	67	48	54	50
Gewichtsunterschied .	+23	+22	+17	+15	+35	+14	+27	+13	+16	+13
Diagnose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dosis 0,01 γ

Nr.:	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bezeichnung:	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	männl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	3136	3101	2455	3359	1507	2134	1135	3297	2062	2455
Anfangsgewicht . . .	38	35	37	41	34	35	37	38	37	37
Endgewicht.	60	42	48	64	42	54	54	54	54	44
Gewichtsunterschied .	+22	+ 7	+11	+23	+ 8	+19	+17	+16	+17	+ 7
Diagnose	+	—	—	—	?	—	—	—	?	—

Dosis 0,005 γ

Nr.:	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Bezeichnung:	schw.	w.	schw.	w.	schw.	w.	w. l.	w. r.	w. l.	w. r.
Geschlecht:	weibl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.	weibl.
Nr. des Wurfes:	3101	2455	1923	2715	3359	1923	3124	3297	2062	1507
Anfangsgewicht . . .	38	34	37	36	36	39	42	34	35	36
Endgewicht.	47	49	52	42	52	56	65	46	45	55
Gewichtsunterschied .	+ 9	+15	+15	+ 6	+16	+17	+23	+12	+10	+19
Diagnose	?	?	?	—	+	+	?	?	—	?

Tabelle 43

Nr. 1160 (Kontrollpräparat)

Tagesdosis in γ . .	0,09	0,08	0,07	0,06
Rachitisch	—	—	1	4
Fraglich	—	—	2	1
Geschützt	10	9	7	4
Nicht gewertet . .	—	1	—	1
Geschützt . . . %	100	90	70	40

Die antirachitische Grenzdosis liegt zwischen 0,07 und 0,08 γ.

Nr. 1143

Tagesdosis in γ . .	0,05	0,02	0,01	0,005
Rachitisch	—	3	4	9
Fraglich	1	4	3	1
Geschützt	9	3	3	—
Geschützt . . . %	90	30	30	—

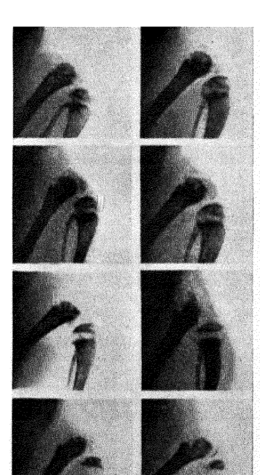
Die antirachitische Grenzdosis liegt zwischen 0,02 und 0,05 γ, näher bei 0,05 γ.

Nr. 1155

Tagesdosis in γ . .	0,05	0,03	0,01	0,005
Rachitisch	—	—	1	2
Fraglich	—	—	2	6
Geschützt	10	10	7	2
Geschützt . . . %	100	100	70	20

Die antirachitische Grenzdosis liegt zwischen 0,01 und 0,03 γ.

Bei deutlicher Rachitis mit unscharfer Epiphysenfuge oder bei völlig geschützten Tieren ist die Beurteilung nicht schwer. Schwieriger ist die Diagnose, wenn die Rachitis nicht ganz ausgeprägt war. Dann legt man der Bewertung das Bild der normalen Ratte zugrunde. Beispiele sind in Abb. 63 zu sehen.



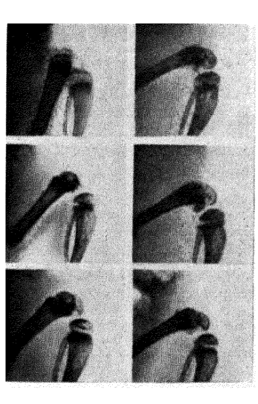


Abb. 63. Röntgenbild der Kniegelenke rachitischer (links) und normaler Tiere (rechts).

Die beiden linken Bilderreihen stellen von oben nach unten Beispiele für ? Rachitis, + Rachitis, ++ und +++ Rachitis dar. (Nach Scheunert.)

Die Fehlergrenze ist um so geringer, je weniger unsichere Fälle vorkommen.

Man nimmt 10 Tiere für jede Dosis, da individuelle Unterschiede weitgehend ausgeschaltet werden müssen. Bei der Auswertung müssen die Tiere der Kontrollgruppe sämtlich Rachitis aufweisen. Wenn mehr als 1 Tier von

den 10 Kontrollen nicht rachitisch war, ist der ganze Versuch zu wiederholen. — Alle Tiere, die in der 14tägigen Versuchsperiode weniger als 5 g zunehmen und sich als rachitisfrei erweisen, werden nicht bewertet. Ist dagegen auch bei ihnen eine Rachitis aufgetreten, sind sie brauchbar, als Beweis der Unwirksamkeit der Dosis. Auch besonders schnell wachsende Tiere, die einen höheren D-Bedarf haben und bei Dosen, die normalerweise schützen, ungeschützt bleiben, können den Versuch stören. Bei Zunahmen von 18 g aufwärts treten solche Fälle ein.

Vollkommener Rachitisschutz liegt dann vor, wenn 8 von 10 Tieren durch die Röntgendiagnose als einwandfrei geschützt gelten. Die Dosis, die diese Wirkung hervorbringt, bezeichnet man als eine antirachitische Schutzeinheit = SED.

Beispiel: Vigantolauswertung.

Tabelle 44

Dosen in γ:	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
Ergebnis:	10—	10—	10—	9— 1+	7— 3?	5— 4+ 1?

Die negativen Kontrollen zeigten bis auf eine deutliche Rachitis. Die Einheit liegt nach obigen Forderungen bei 0,4 γ.

e) Prophylaktische chemische Methoden

1. Der Knochenaschetest nach Hume-Pickersgill und Gaffikin 53).

Die Bestimmung der Knochenasche oder des Mineralgehaltes des Knochens kann als Test auf Vitamin D dienen, da die Menge der Asche abhängig ist vom Vitamin D-Gehalt der Kost. Der Aschentest ist eine sehr objektive Methode, die viel schwerer auszuführen ist als etwa der Line-Test oder als ein Röntgentest, die aber doch manche Vorteile bietet. Sie ist nur in den Fällen ungeeignet, wo es sich darum handelt, große Serien von Präparaten auszuwerten, da sie viel Zeit und Mühe erfordert. Im einzelnen wird die Methode wie folgt gehandhabt:

Junge Ratten aus eigener Zucht, deren Abstammung und Ernährung bekannt sein muß, werden im Alter von 21—28 Tagen mit einem Gewicht von 35—45 g in Einzelkäfige gesetzt und erhalten die rachitogene Kost Nr. 3143 von Mc. Collum. Dazu füttert man täglich die zu untersuchende Substanz in Olivenöl, und zwar erhalten die Tiere, wenn sie am Sonntag nicht gefüttert werden, die Dosis des Sonntags zur Hälfte am Sonnabend und zur Hälfte am Montag. Bei der Zufütterung, die mit der Pipette geschehen muß, ist darauf zu achten, daß alle Tiere der verschiedenen Serien stets dieselbe Menge an Olivenöl erhalten, da durch Verfütterung verschiedener Ölmengen der Knochen verschieden fetthaltig wird, was die Ergebnisse stören kann.

Die Verteilung der Tiere eines Wurfs erfolgt genau wie bei allen Testversuchen, indem ein Tier unbehandelt bleibt, eins ein bekanntes Standardpräparat erhält, die anderen steigende Dosen der Substanz. Für die Auswertung einer unbekannten Substanz sind selbstverständlich mehrere Würfe erforderlich. Man nimmt am besten 4 Serien von Tieren (je 8—10), von denen die ersten beiden 0,1 und 0,2 E. pro die erhalten, die anderen beiden zwei verschiedene Dosen der zu testenden Substanz.

53) Hume c. s., Biochemic. J. 26, 488 (1932).

Nach 28—33 Tagen werden die Tiere getötet (selbstverständlich in einem Versuch immer am selben Tag) und Femur, Tibia und Fibula sauber präpariert, die Knochen mehrmals gebrochen und getrocknet. Nach Feststellung des Trockengewichts extrahiert man die Knochen im Soxleth-Apparat mit Alkohol und dann mit Äther. Darauf werden sie verascht (am besten kleine Platinschalen).

Die Ergebnisse werden entweder in Prozent Asche der fettfreien Trockensubstanz oder durch den Quotienten Asche : organische Trockensubstanz (A/R) **54), 54a)** ausgedrückt. Eine Zurückführung der Werte auf fetthaltige trockene Substanz ist nicht zu empfehlen. Die Aschen der linken und rechten Extremitäten eines Tieres differieren nur um 0,5 %. Ratten auf der rachitogenen Diät ohne Behandlung zeigen Aschenwerte von 24,9—44,9 % (negative Kontrollen).

Diese erhebliche Schwankungsbreite muß man in Rechnung setzen. Deshalb geht man bei der Auswertung der Ergebnisse stets vom Aschegehalt des unbehandelten Tieres des Wurfes aus. Die Auswertung erfolgt dabei nach einer der Kurven der Abb. 64, je nachdem die unbehandelten Tiere einen Aschewert von über oder unter 35 % aufweisen. Man sucht in dem Koordinatensystem an der Ordinate die Aschewerte auf und liest an der Abszisse die Wirksamkeit ab. Aus der Kurve ist ersichtlich, daß bei geometrischer Erhöhung der Dosen die Asche arithmetrisch zunimmt. Wir haben also genau wie bei dem Röntgentest eine logarithmische Beziehung zwischen Wirkung und Dosis.

Ein Beispiel sei in folgender Tabelle beschrieben, in der bekannte Dosen eines D-Präparats ausgewertet wurden:

Tabelle 45. Percentage ash in the dried fat-extracted bones of young rats on McCollum's rachitogenic diet and receiving various doses of irradiated ergosterol, prophylactically for 24—33 days

No. of litter	Sex	Dose of irradiated ergosterol in international units of vitamin D (1 unit = 0,1 γ of irradiated ergosterol)										
		0	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,1	0,2	0,32	0,64	1,28
1826	♂	41,1	—	40,7	41,6	—	41,1	—	45,2	—	—	—
	♀	—	38,3	—	—	42,2	—	41,3	—	44,1	—	—
1827	♂	—	—	—	—	38,7	—	39,3	—	41,4	—	—
	♀	36,2	34,3	42,2	38,9	—	39,7	—	44,1	—	—	—
1914	♂	39,5	38,6	—	41,2	40,3	—	42,7	43,4	—	—	46,8
	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	47,5	47,7	—
1917	♂	—	—	—	—	—	—	44,5	42,6	—	—	—
	♀	43,3	37,9	—	40,9	44,2	—	—	—	48,8	48,0	47,4
1915	♂	39,9	41,6	—	41,4	—	—	—	—	44,3	—	—
	♀	—	—	—	—	43,5	—	45,3	45,3	—	48,8	49,8
1943	♂	—	—	—	—	43,0	—	—	—	46,8	48,5	47,9
	♀	40,1	47,9	—	40,0	—	—	43,4	47,5	—	—	—
1954	♂	40,8	45,3	—	48,0	—	—	52,1	52,4	—	48,3	50,2
	♀	—	—	—	—	47,3	—	—	—	53,6	—	—
1963	♂	41,7	40,8	—	39,0	47,5	—	47,5	49,4	48,7	—	—
	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	51,3	48,2
1965	♂	—	—	—	42,5	—	—	—	43,3	—	45,1	47,1
	♀	44,9	43,8	—	—	41,6	—	41,4	—	47,4	—	—
1991	♂	38,0	39,9	—	43,9	44,2	—	43,3	—	—	—	—
	♀	—	—	—	—	—	—	—	44,5	46,4	49,2	48,9

54) Chick-Roscoe, Biochemic. J. 20, 622 (1926).
54a) Dutcher c. s., J. of biol. Chem. 66, 401 (1925).

No. of litter	Sex	Dose of irradiated ergosterol in international units of vitamin D (1 unit = 0,1 γ of irradiated ergosterol)										
		0	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,1	0,2	0,32	0,64	1,28
1828	♂	32,6	31,8	—	33,5	—	40,7	38,3	40,3	43,1	—	—
	♀	—	—	38,1	—	39,7	—	—	—	—	—	—
1834	♂	34,6	38,1	36,8	36,7	39,3	39,6	—	—	—	—	—
	♀	—	—	—	—	—	—	38,7	40,4	41,2	—	—
1854	♂	—	—	—	—	36,7	—	—	—	—	—	—
	♀	32,5	33,7	36,0	36,5	—	39,5	45,0	46,0	45,8	—	—
1869	♂	—	33,8	31,9	31,4	—	—	—	—	—	—	—
	♀	33,7	—	—	—	31,4	36,4	34,6	41,4	43,3	—	—
1867	♂	—	—	—	—	—	—	—	31,7	37,3	—	—
	♀	28,4	33,1	28,5	27,0	27,1	30,3	34,9	—	—	—	—
1875	♂	—	—	36,4	—	38,2	—	44,4	—	41,6	—	—
	♀	31,0	37,3	—	38,8	—	39,6	—	47,4	—	—	—
1988	♂	35,0	39,1	—	—	44,4	—	43,5	44,0	47,8	—	—
	♀	—	—	—	48,1	—	—	—	—	—	49,8	46,8
2057	♂	—	—	—	—	—	—	—	—	43,4	45,6	43,0
	♀	27,5	32,6	—	34,5	38,9	—	39,1	44,8	—	—	—
2060	♂	31,3	30,1	—	36,1	39,7	—	43,2	45,4	46,3	—	—
	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48,8	48,2
2095	♂	24,9	29,1	—	32,6	35,1	—	—	41,9	44,1	—	—
	♀	—	—	—	—	—	—	40,1	—	—	47,2	47,6
v. of 20 litters		35,9	37,4	—	38,6	40,2	—	42,2	44,1	45,2	—	—
v. of first 10 litters; 0 dose, ash over 35%		40,6	40,8	—	41,7	43,3	—	44,1	45,8	46,9	—	—
v. of last 10 litters; 0 dose, ash under 35%		31,2	33,9	—	35,5	37,1	—	40,2	42,3	43,4	—	—
v. of 8 litters including 0,02 and 0,08 unit doses		33,8	35,1	36,3	35,6	36,7	38,4	39,6	42,1	42,2	—	—
v. of 12 litters including 0,64 and 1,28 unit doses		37,3	38,9	—	40,7	42,5	—	43,9	45,4	47,1	48,2	47,7

Tabelle 46. The same series of averages, calculated as the A/R ratio

	Dose of irradiated ergosterol in international units of vitamin D (1 unit = 0,1 γ of irradiated ergosterol)										
	0	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,1	0,2	0,32	0,64	1,28
Av. of 20 litters	0,58	0,61	—	0,64	0,69	—	0,74	0,80	0,83	—	—
Av. of first 10 litters; 0 dose, ash over 35%	0,69	0,70	—	0,72	0,77	—	0,80	—	0,89	—	—
Av. of last 10 litters; 0 dose, ash under 35%	0,46	0,52	—	0,56	0,60	—	0,68	0,74	0,77	—	—
Av. of 8 litters including 0,02 and 0,08 unit doses	0,52	0,55	0,58	0,56	0,59	0,63	0,66	0,74	0,73	—	—
Av. of 12 litters including 0,64 and 1,28 unit doses	0,61	0,65	—	0,70	0,75	—	0,79	0,84	0,90	0,93	0,91

Tabelle 47. The same series of averages, calculated as percentage ash in the dry non-extracted bone

Av. of 20 litters	31,7	32,6	—	34,0	35,1	—	37,0	37,8	38,4	—	—
Av. of first 10 litters; 0 dose, ash over 35 %	34,9	35,8	—	36,9	37,9	—	39,0	39,7	40,6	—	—
Av. of last 10 litters; 0 dose, ash under 35 %	28,4	29,4	—	31,1	32,3	—	34,9	35,9	36,1	—	—
Av. of 8 litters including 0,02 and 0,08 unit doses	29,4	29,9	32,6	31,3	32,2	33,8	34,6	35,9	36,3	—	—
Av. of 12 litters including 0,64 and 1,28 unit doses	33,1	34,4	—	35,8	37,1	—	38,5	39,1	39,7	40,8	39,3

Abb. 64 bringt die Auswertungskurve für die Ergebnisse:

Abb. 65, nach der die Ergebnisse auch ausgewertet werden können, zeigt die logarithmische Beziehung zwischen Wirkung und Dosis. Wie ersichtlich, gilt sie jedoch nur bis zu einem D-Wert von 1,28 E., weil die Verkalkung durch den Phosphorgehalt der Diät begrenzt wird. Bei kleinen Dosen besteht ebenfalls keine Übereinstimmung. Der Aschentest muß deshalb mit Dosen von 0,03—0,64 E. D. pro Tag ausgeführt werden und liefert richtige Ergebnisse, die mit den nach anderen Methoden gewonnenen sich decken.

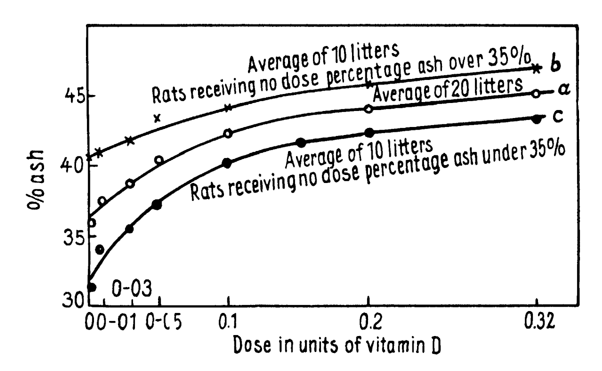


Abb. 64. Aschewerte in % der getrockneten, extrahierten Knochen junger Ratten auf der rachitogenen Kost 3143, die steigende Dosen des intern. Vitamin D-Standards enthielten. (Nach Hume.)

Eine Vereinfachung der Berechnung der Wirksamkeit aus den Aschewerten haben Bourdillon und Bruce angegeben 55). Danach stehen die Aschenwerte der Tiere, die mit dem bekannten Standardpräparat behandelt wurden, mit dem Aschenwert der Versuchstiere und mit der Wirksamkeit des unbekannten Präparats in Beziehung nach der Gleichung:

$$\log \frac{D_1}{D_2} = \frac{(n_2 - n_1) \cdot \log 2}{X},$$

wo D_1 und D_2 die Dosen sind, die die Aschenprozente n_2 und n_1 geben und X die Vermehrung der Asche bei Verdoppelung der Vitamindosis darstellt. Aus dieser Gleichung erhält man die Beziehung zwischen bekannter und unbekannter Dosis.

Key und Morgan verglichen den Line-Test (s. oben) mit der prophylaktischen Aschenmethode und fanden gute Übereinstimmung. Sie fütterten die Tiere mit der Steenbock-Kost 28 Tage lang unter Zugabe der zu untersuchenden Substanz,

55) Bourdillon-Bruce, Biochemic. J. 26, 506 (1932).

töteten sie und veraschten die getrockneten, extrahierten Knochen. Bei der Auswertung von Fischmehl ergab sich folgendes Bild, für die negativen Kontrollen, positiven Kontrollen (0,1 E. D) und Versuchstiere, die in der Kost 0,5 % Fischmehl erhielten:

Tabelle 48

Litter	Showing percentage ash in dry fat-free bones of rats receiving					
	No dose		0,5 % fish meal		0,1 unit vitamin D	
	Rat	% Ash	Rat	% Ash	Rat	% Ash
1199	6975	27,0	6977	41,1	6979	46,1
	6976	26,25	6978	37,3	6980	40,7
1193	6940	29,1	6942	32,3	6944	39,4
	6941	33,8	6943	40,5	6945	40,6
1208	7027	31,6	7029	38,0	7031	31,9
	7028	30,1	7030	40,7	7032	40,9
1213	7051	30,2	7052	37,3	7053	42,3
1218	7074	26,8	7075	31,0	7076	39,3
Average values		29,4		37,3		40,1

Die Tiere fraßen im Durchschnitt pro Tag 0,039 g des Fischmehls. Diese Menge entspricht fast einer Dosis von 0,1 E. Vitamin D. 1 g Fischmehl enthält also 2,5 E. Vitamin D. Nach dem Line-Test ergab sich bei den unbehandelten Tieren ein Skalenwert von 0,7. Die Ablesung der Werte mußte also an der Kurve für schwere Rachitis erfolgen. Die Kost mit 2,5 % Fischmehl ergab einen Skalenwert von 5,1. Die Verabreichung von 0,25 E. Vitamin D führte zu einem Wert von 4,35. Die Tiere fraßen etwa 0,22 g Fischmehl pro Tag. Bei der Auswertung ergab sich ein Wert von 2,75 E. Vitamin D pro Gramm des Mehls.

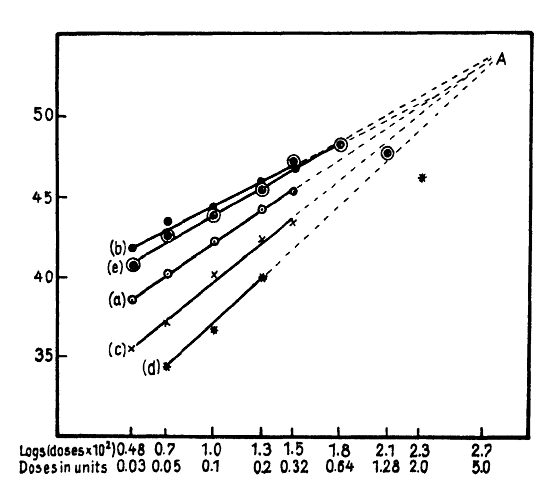


Abb. 65. Kurve zur Umrechnung der Aschewerte (Ordinate in %) in Vitamin D-Einheiten. Kurven a, b, c sind dieselben wie in Abb. 64. (Nach Hume.)

Steenbock-Hart und Hanning 56) modifizierten die Aschenmethode, indem sie als weiteres Kriterium außer dem Aschenwert auch noch die Dicke der Gelenke und Breite von Radii, Ulnae und Metaphyse messen, die bei der Rachitis aufgetrieben sind. Sie nehmen junge Ratten im Alter von 22—25 Tagen mit einem Gewicht von etwa 60 g. Die Tiere erhalten die Steenbock-Kost, werden wöchentlich gewogen und einzeln in Käfigen gehalten. Die Einteilung in Serien geschieht wie oben. Die Tiere erhalten prophylaktisch 5 Wochen lang die zu untersuchende Substanz. Die Knochen werden freipräpariert. Die Aschenbestimmung geschieht in der fettfreien Trockensubstanz (Femur). Die Rippen werden makroskopisch untersucht, die Gelenke mikroskopisch nach der Methode von Hopkins. Ein Beispiel geht aus folgender Tabelle hervor:

56) Steenbock c. s., J. of biol. Chem. 88, 197 (1930).

Tabelle 49. Antirachitic Value of Milk

Bone Analyses of Rats on a Rachitogenic Ration Plus 4 Cc. of Milk Daily from Cows Which Received 200 Gm. of Non-Irradiated or Irradiated Yeast Daily

Rat No.		Condition of costochondral junctions	Width of: Radii	Ulnae	Metaphyses	Ash in femora: Average for rat	Average for group	Average for rat	Average for group
			mm.	mm.	mm.	mg.	mg.	per cent	per cent
69 ♂	Cow 1. Non-irradiated	Very much enlarged	3,5	3,0	2,0	40,8		32,4	
70 ♂	yeast	,, ,,	3,0	2,5	2,0	43,3		34,3	
71 ♀	period	,, ,,	3,0	2,5	2,0	41,2		34,3	
72 ♂		Slightly enlarged	3,0	2,5	1,0	81,9	51,8	47,0	37,0
93 ♂	Cow 2. Non-irradiated	Very much enlarged	3,0	2,0	2,0	38,1		30,6	
94 ♀	yeast	Enlarged	3,0	3,0	1,5	48,8		38,4	
95 ♀	period	Very much enlarged	3,0	2,0	1,5	41,0		35,1	
96 ♀		,, ,,	3,0	2,5	2,0	39,5	41,9	32,7	34,2
73 ♀	Cow 1. Irradiated	Normal	3,0	2,0	< 0,5	94,3		53,7	
74 ♂	diated	,,	3,0	2,0	< 0,5	84,8		50,9	
75 ♂	yeast	,,	3,0	2,0	< 0,5	89,0		49,6	
76 ♂	period	,,	2,5	2,0	< 0,5	114,6	95,7	52,5	51,7
97 ♀	Cow 2. Irradiated	Normal	2,5	2,0	< 0,5	90,1		50,6	
98 ♂	diated	,,	2,5	2,0	< 0,5	93,1		51,1	
99 ♀	yeast	,,	2,5	2,0	< 0,5	99,8		53,8	
100 ♀	period.	,,	2,5	2,0	< 0,5	94,3	94,3	53,6	52,3

2. Der Knochenkalktest von Sherman-Stiebeling 57).

Sherman und Stiebeling gehen in der Bestimmung des Vitamins D einen ganz anderen Weg, indem sie nicht mit einer rachitogenen Kost arbeiten, in der neben dem D-Mangel auch das Verhältnis der Mineralien gestört ist, sondern mit einer Kost, die in jeder Beziehung ausbalanciert ist und in der nur das Vitamin D fehlt.

Tiere auf einer solchen Kost zeigen Verkalkungsstörungen, die durch Verabreichung des Vitamins D spezifisch verhütet oder geheilt werden können. Auch das Wachstum der Tiere ist gestört (Wachstumstest). Der Test beruht auf der Erscheinung, daß im prophylaktischen Versuch die Aschenmenge der Knochen dem verabreichten Vitamin D proportional ist.

Junge Ratten aus einer Zucht mit der Sherman-Diät B werden im Alter von 21—28 Tagen auf die oben angegebene Kost gesetzt. Sie wiegen bei Versuchsanfang etwa 25—45 g. Die Tiere werden in Gruppen aufgeteilt, wodurch gleichwertige Serien entstehen. Für die Auswertung einer Substanz benötigt man mindestens 5 Würfe. Die Tiere erhalten serienweise 1. das Grundfutter ohne Zulage, 2. eine bestimmte Dosis Vitamin D oder aber UV.-Bestrahlung, 3. die zu untersuchende Substanz in verschieden abgestuften Dosen. Die Tiere werden am 56. Le-

57) Sherman-Stiebeling, J. of biol. Chem. 88, 687 (1930;) 83, 497 (1929); Dissertation New York 1928.

Tabelle 50. Comparison of Precision of Several Criteria for Expressing Degree of Calcification of Bones, in Four Series of Experiments

Series.	Preexperimental period	Experimental period		Green femur No. of rats	Green femur Ash Mean	Green femur Ash P.E.*)	Green femur Ca Mean	Green femur Ca P.E.*)	Dried extracted femur No. of rats	Dried extracted femur Ash Mean	Dried extracted femur Ash P.E.*)	Dried extracted femur Ca Mean	Dried extracted femur Ca P.E.*)	Ash No. of rats	Ash Organic residue, ratio
	days	days			per cent		per cent			per cent		per cent			
A	0	28	Positive control group	17	26,5	±0,20	9,69	±0,09	17	53,6	±0,36	19,6	±0,14	17	1,16±0,016
			Negative control group	36	20,6	±0,19	7,72	±0,07	36	47,8	±0,32	17,8	±0,12	36	0,92±0,011
			Difference		5,9	±0,28	1,97	±0,11		5,8	±0,48	1,8	±0,18		0,24±0,019
			Critical ratio**)		21		18			12		10			13
B	0	35	Positive control group	14	28,1	±0,36	10,45	±0,14	14	59,4	±0,34	22,1	±0,11	14	1,47±0,019
			Negative control group	20	22,5	±0,27	8,31	±0,10	30	54,0	±0,33	20,0	±0,13	20	1,17±0,020
			Difference		5,6	±0,45	2,14	±0,17		5,4	±0,47	2,1	±0,17		0,30±0,028
			Critical ratio		12		13			12		12			11
C	24	28	Positive control group	11	30,9	±0,57	11,70	±0,25	11	59,3	±0,52	22,5	±0,26	11	1,46±0,031
			Negative control group	13	25,6	±0,34	9,52	±0,13	13	53,2	±0,45	19,8	±0,23	13	1,15±0,024
			Difference		5,3	±0,66	2,18	±0,28		6,1	±0,69	2,7	±0,35		0,31±0,039
			Critical ratio		8		8			9		8			8
D	31	28	Positive control group	19	29,3	±0,30	10,96	±0,16	18	58,1	±0,31	21,7	±0,14	19	1,40±0,018
			Negative control group	13	20,4	±0,52	7,41	±0,18	13	47,7	±0,79	17,4	±0,30	13	0,93±0,030
			Difference		8,9	±0,60	3,55	±0,24		10,4	±0,84	4,3	±0,33		0,47±0,035
			Critical ratio		15		15			12		13			13

Tabelle 51. Effect upon Growth and Calcification of Adding Graded Portions of Whole Milk Powder between 21st and 56th Days

Additions of milk	No. of cases	Average weight Initial	Average weight Final	Average gain	Average weight femur Fresh	Average weight Femur Ca	Ca in fresh femur, per cent ± a. d.	Improvement over negative controls Per cent improvement	Improvement over negative controls Relative to positive controls
		gm.	gm.	gm.	gm.	gm.			
Negative controls . . .	13	30	77	47	0,304	0,0246	8,09 ± 0,83		
750 mg. per wk.. . .	13	31	92	61	0,347	0,0286	8,24 ± 1,06	0,15	6
1500 ,, ,, ,, . . .	13	30	103	73	0,345	0,0311	9,01 ± 0,76	0,92	39
2250 ,, ,, ,, . . .	13	29	98	67	0,355	0,0353	9,94 ± 0,73	1,85	78
Positive controls . . .	17	30	98	68	0,364	0,0381	10,47 ± 0,60	2,38	100

*) P. E. indicates the probable error.

**) The term critical ratio is here used to indicate the ratio of the difference to its probable error.

benstag getötet, die Knochen freipräpariert, der Femur gewogen, verascht und die Asche bestimmt.

Die Bestimmung der Aschenmenge in der Feuchtsubstanz, in der Trockensubstanz, die extrahiert wurde und andere Ausdrucksformen der Werte sind gleichwertig. Eine Bestimmung der Asche in der feuchten Substanz ist aber aus Zeitersparnis vorzuziehen. Die Tabelle 50 zeigt die verschiedenen Ausdrucksweisen der Ergebnisse.

Aus Tabelle 51 und 52 ist ein Beispiel ersichtlich.

Tabelle 52. Effect of Graded Amounts of Supplementary Vitamin D upon Calcium Content of Femur

	Supplement to basal diet per wk	Cases	Pre-experimental period	Experimental period	Ca in green femur	
						Relative to controls
			days	days	per cent	per cent
Series I	None	12	0	35	7,9	
	0,75 gm. whole milk powder	10	0	35	8,0	
	1,50 ,, ,, ,, ,,	11	0	35	8,9	37
	2,25 ,, ,, ,, ,,	8	0	35	9,7	68
	Ultra-violet irradiation *)	11	0	35	10,6	100
Series II	None	6	31	28	7,8	
	1,50 gm. whole milk powder	6	31	28	8,9	32
	3,00 ,, ,, ,, ,,	7	31	28	10,3	74
	4,50 ,, ,, ,, ,,	9	31	28	11,0	94
	Ultra-violet irradiation *)	10	31	28	11,2	100
Series III	None	5	70—96	56	8,7	
	0,75 gm. whole milk powder	5	70—96	56	10,0	41
	1,50 ,, ,, ,, ,,	7	70—96	56	10,8	66
	3,00 ,, ,, ,, ,,	6	70—96	56	12,3	111
	Ultra-violet irradiation *)	4	70—96	56	11,9	100
Series IV	None	6	0	28	7,7	
	18 cc. fresh whole winter milk	6	0	28	8,4	29
	24 ,, ,, ,, ,, ,,	4	0	28	8,7	42
	48 ,, ,, ,, ,, ,,	4	0	28	9,2	63
	60 ,, ,, ,, ,, ,,	3	0	28	9,5	75
	Ultra-violet irradiation *)	9	0	28	10,1	100
Series V	None	7	31	28	7,1	
	24 cc. fresh whole winter milk	7	31	28	8,0	21
	48 ,, ,, ,, ,, ,,	6	31	28	8,5	33
	60 ,, ,, ,, ,, ,,	3	31	28	9,3	51
	Ultra-violet irradiation *)	7	31	28	11,4	100

*) 10 minutes daily (except Sunday) during the experimental period. The bottom of the cage was 22 inches from the arc of Alpine sun lamp No. 1111, operated on a D. C. of 110 volts; capacity 4 amperes; arc 8,0 cm.; manufactured by Hanovia Chemical and Manufacturing Company. According to Anderson (Hanovia Chem. and Mfg. Co., Research Lab. Bull. No. 200 (1925)), lamps of this description emit an ultra-violet radiation of such a nature that in a solution containing 6,3 gm. of pure oxalic acid and 4.27 gm. of uranyl sulfate ($UO_2 \cdot SO_4 \cdot 3H_2O$) per liter, exposed in a rectangular quartz cell in a layer 1.8 cm. thick at a distance of 8 inches from the arc, the decomposition of 1 mg. of oxalic acid in 30 minutes corresponds to the absorption of 4.84×10^5 ergs per sq. cm. per second.

Die Werte der Aschen werden mit denen der Tiere desselben Wurfs verglichen und relativ zu der Aschenmenge des unbehandelten Tieres und des mit einer bekannten Dosis behandelten Tieres gewertet.

Die Methode hat sich bei der Bestimmung des D-Gehalts der Milch gut bewährt. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse für den D-Gehalt der Milch spezifisch waren und nicht etwa durch andere Milchbestandteile, wie Phosphate, hervorgerufen wurden.

Hume-Smith-Smedley-McLean 58) benutzten die Kost von Leigh-Clare und verglichen sie mit ihrer eigenen Diät F. Die Ergebnisse waren durchaus zufriedenstellend.

f) Weitere als Test auf Vitamin D vorgeschlagene Reaktionen

Stoffwechselwirkung des Vitamins D. Bei größeren Tieren, wie Kaninchen, Hund und Ziege, ist die Stoffwechselwirkung des Vitamins D zur Auswertung unbekannter Substanzen herangezogen worden. Die Methode gibt zuverlässige Werte, ist aber umständlich. Sie kann natürlich auch bei Ratten angewandt werden (Boas 59)). Dagegen ist die von Warkany 60) als Test vorgeschlagene Reaktion, die Erhöhung des Blutphosphatspiegels nach großen D-Gaben, unspezifisch.

Versuche an Hühnchen. Aus letzter Zeit liegen Versuche an Kücken vor, die prophylaktisch mit der zu untersuchenden Substanz behandelt wurden. Sie erhalten vom ersten Tag ab eine Kost aus 20 Teilen Magermilch, 20 Teilen Weizenmehl, (mittel), 2 Teilen Knochenmehl, 57,5 Teilen Maismehl und 0,5 Teilen Kochsalz. Sie zeigen, wenn man sie unbehandelt läßt, in etwa 7 Wochen Rachitis. Als Kriterium der Wirkung des Vitamins D gelten Blut-, Kalk- und Phosphatwerte, auch die Bestimmung der Knochenasche wurde herangezogen. In manchen Fällen stützt sich die Beurteilung der Befunde auf eine Röntgenaufnahme oder auf ein Sektionsprotokoll. Nach Dols 61) zeigen rachitische Kücken eine Einbuchtung der Rippen mit Verdickungen, Erscheinungen, die als Diagnose der Rachitis besser sind als z. B. Knochenaschebestimmung u. a. Die rachitogene Kost bestand nach Dols aus: Weizenmehl (mittel) 60 Teile, Mais (gelb) 144 Teile, Casein (roh) 30 Teile, Hefe 3,5 Teile, Salz 2,5 Teile.

Fast sämtliche Auswertungen am Kücken ergeben, daß es ein Vielfaches der für die Ratte genügenden Menge an Vitamin D benötigt. Weiter wurde festgestellt, daß die Lebertranwirkung eine andere ist, als die des bestrahlten Ergosterins. Der

Tabelle 53

Öl	Zahl der Tiere	Zahl der Tiere nach 6 Wochen am Leben	Gewicht nach 6 Wochen	Prozent Asche in Tibia u. Fibula
		1. Kost von Hart-Kline-Keenan 63)		
Sardinenöl . .	20	17	318,5	42,04
Lebertran . .	20	18	330,8	43,37
Kontrolle . .	20	18	226,6	33,25
		2. Kost von Gutteridge 64)		
Sardinenöl . .	13	13	366,0	42,11
Lebertran . .	14	14	361,4	43,53
Kontrolle . .	14	14	267,4	33,21

58) Hume c. s., Biochemic. J. 22, 980 (1928).
59) Boas, Biochemic. J. 18, 425 (1924). — Bethke c. s., J. Nutrit. 6, 413 (1933).
60) Warkany, Klin. Wschr. 1930, 2152.
61) Dols, Arch. néerl. Physiol. 19, 290 (1934).
63) Hart c. s., Science 73, 710 (1931).
64) Gutteridge, Sci. Agricult. 12, 327 (1932); 13, 374 (1933).

Test ist möglicherweise für Vitamin D nicht spezifisch und beruht vielleicht auf der Bestimmung einer weiteren im Lebertran vorkommenden, von den Vitaminen A und D verschiedenen Substanz, die vom Kücken benötigt wird. Man muß z. B. vom bestrahlten Ergosterin zur Erreichung einer normalen Knochenbildung 15—20mal mehr Ratteneinheiten geben als vom Lebertran.

Als Beispiel sei eine Auswertung nach Biely-Palmer 62) mit zwei verschiedenen Kostformen gebracht. Über die Verfütterung einer Kost mit 1% Öl s. Tabelle 53.

Die leg weakness erzeugende Kost nach Hart c. s. hat folgende Zusammensetzung:

Mais, gemahlen	59	Teile
Weizen, mittel	25	„
Casein, roh	12	„
Calciumcarbonat	1	„
Calciumphosphat	1	„
Hefe	1	„
Salz	1	„

Die hervorgerufene leg weakness ist viel schwerer als auf anderen Kostmischungen, wie z. B. auf der Waddellschen Kost:

Mais, gemahlen	40	Teile
Weizenkleie	20	„
Weizen, mittel	20	„
Alfalfa-Mehl	5	„
Buttertrockenmilch	4	„
Fleisch-Rückstände	4	„
Fischmehl	4	„
Austernschalenmehl	2	„
Salz	1	„

Nach Fütterung vorstehender Mischung erscheinen die Symptome der leg weakness in 3—4 Wochen gleichzeitig mit Wachstumsstillstand. Die ersten Erscheinungen der leg weakness machen sich beim Gehen der Tiere bemerkbar. Sie zeigen ein schwankenden, „schwindeligen Gang“ und sitzen zusammengekauert in einer Ecke des Käfigs. Nach Waddell sind etwa 10 Ratteneinheiten Vitamin D pro 100 g als Prophylaxe gegen leg weakness genügend. An Ergosterin sind dagegen 25mal mehr Ratteneinheiten erforderlich. Die Versuche wurden stets an 1 Tag alten Kücken, die in besonderen heizbaren Käfigen gehalten werden, ausgeführt 64a).

Waddell kommt neuerdings zu der Feststellung, daß das Ergosterin nicht das Provitamin D sein kann, da durch Bestrahlung von Cholesterin gegen die leg weakness sehr viel wirksamere Präparate erhalten wurden als durch UV.-Bestrahlung des Ergosterins oder von Gemischen aus Ergosterin und Cholesterin. Das bestrahlte Cholesterin kommt in der Wirkung der Lebertranprophylaxe gleich. Im Einklang mit dieser Beobachtung steht die Tatsache, daß Kücken außerordentlich leicht auf die UV.-Bestrahlung ansprechen. Eine 3 Minuten dauernde UV.-Bestrahlung genügt schon, um die Tiere auf der leg weakness erzeugenden Kost 1 Woche lang wirksam zu schützen (Scott 64b)).

62) Biely c. s., Sci. Agricul. 14, 136 (1933).

64a) Mussehl c. s., Poultry Sci. 9, 334 (1930). — Russell c. s., Dass. 10, 269 (1931); J. of biol. Chem. 99, 109 (1933); 80, 155 (1928); 91, 493 (1931). — Steenbock c. s., J. of biol. Chem. 97, 249 (1932). — Bethke c. s., J. Nutrit. 6, 413 (1933). — Waddell, J. of biol. Chem. 105, 720 (1934).

64b) Scott c. s., Poultry Sci. 9, 65 (1929). — Hess c. s., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 27, 609 (1930).

E. Fehlergrenzen und Auswertungsbereich

Nach Bills (l. c. 32) soll die Fehlergrenze des Line-Test etwa 10—14 % betragen. Der kurative Röntgentest nach Bourdillon c. s. (l. c. 42) arbeitet beim Vergleich zweier Substanzen an 20 Rattenpaaren mit einer Genauigkeit von 10 %. Unter denselben Bedingungen hat die prophylaktische Röntgenmethode von Bourdillon (l. c. 50) eine Fehlergrenze von 12—15 %, wenn die Auswertung mit Dosen geschieht, die zwischen 0,05—0,2 E. liegen. Bei größeren oder kleineren Dosen steigen die Fehlermöglichkeiten erheblich. Die prophylaktische Methode der Knochenaschebestimmung zeigt in den Grenzen 0,03—0,64 E. den kleinsten Fehler von 13—16 %. Der Line-Test nach Morgan (l. c. 40) bestimmt das Verhältnis zweier Substanzen an 20 Rattenpaaren mit einem wahrscheinlichen Fehler von 5,4 %. Der Line-Test von Coward erreicht bei Dosen zwischen 0,2 und 1,5 E. eine Genauigkeit von etwa 12 % (Coward, l. c. 36).

IV. Spektroskopische Untersuchung auf Vitamin D

Die spektroskopische Untersuchung auf Vitamin D z. B. nach der Methode von Tixier 64c), ist für Reihenversuche zu umständlich und schwierig, als daß sie den biologischen Versuch ersetzen könnte. Auch sollen bei biologisch gleichwertigen Präparaten damit unterschiedliche Werte erhalten sein. Absorptionsspektren des Vitamins D und des Ergosterins wurden besonders von Bourdillon c. s., Morton c. s. und Pohl beschrieben (s. l. c. 1—3)).

V. Der Vitamin D-Standard 65)

Der von der Vitaminkonferenz des Völkerbundes festgelegte Standard ist eine 0,01 %ige Lösung von bestrahltem Ergosterin in Olivenöl. 1 mg dieser Lösung ist eine Einheit (MRC.-Einheit, Medical Research Council-Einheit).

Die Herstellung geschieht durch Bestrahlung einer 0,1 %igen Lösung von reinem Ergosterin in absolutem Alkohol 30 Minuten lang im rotierenden Quarzrohr mit unfiltriertem Quecksilberdampflicht aus 15 cm Abstand. Der Alkohol wird unter vermindertem Druck bei 45° entfernt und der Rückstand in Olivenöl zu 0,01 % gelöst. Eine Einheit ist also 0,0001 mg = 0,1 γ.

Die Einheit ist mit der Coward-Einheit identisch. Auch die englische Einheit, d. h. diejenige Menge, die nach 8tägiger Behandlung täglich verabreicht, bei rachitischen Ratten beginnende Heilung erkennen läßt (bei mindestens 20 Tieren) ist der MRC.-Einheit gleich.

Der Standard ist vom Reichsgesundheitsamt zu beziehen.

1 MRC.-Einheit entsprechen 5—6 Poulsson-Einheiten oder 6—8 Schutzeinheiten.

100 Schutzeinheiten sind gleich 1 klinischen Einheit (Laquer).

Die internationale Einheit wurde von der Londoner Vitaminkonferenz 1934 beibehalten.

Erwähnt sei noch, daß die oft benutzte Steenbock-Einheit etwa 2,7 internationalen Einheiten gleichkommt.

64c) Tixier, C. R. Acad. Sci. Paris 188, 203 (1929).

65) Vitamins: A survey of present knowledge, London, His Majestys State Office 1932, Med. Res. Council Spez. Rep. ser. 167. — Steenbock, J. of biol. Chem. 97, 249 (1932).

VI. Der Vitamin D-Bedarf (siehe l. c. 1—3)

Fast alle Laboratoriumstiere benötigen das Vitamin D. Der Bedarf ist abhängig von der Mineralrelation der Nahrung.

Der Bedarf der Kinder liegt bei etwa 1 klinischen Einheit pro die. Zur Heilung einer Rachitis sind mindestens 5 klinische Einheiten pro die erforderlich.

Auf genügende D-Zufuhr muß ganz besonders geachtet werden. Das Vitamin D ist fast das einzige Vitamin, das in der Kost unserer Breiten fehlen kann.

VII. Speicherung des Vitamins D (siehe l. c. 1—3)

Für den Tierversuch wichtig ist die D-Speicherung, die bestimmte Ratten für den D-Test überhaupt unbrauchbar machen kann. Erhält eine Rattenzucht reichlich fettlösliche Vitamine, so läßt sich gewöhnlich bei den Jungen keine Rachitis erzeugen. Auch die Resistenz kleinerer Würfe ist auf D-Speicherung zurückzuführen. Ebenso kann eine bestehende Rachitis durch einmalige Zufuhr einer großen D-Dosis abheilen, weil das Vitamin zunächst in den Depots abgelagert wird. Als solche kommen in Frage die Haut-, Muskel- und Fettgewebe und bei Vögeln namentlich die Bürzeldrüse.

VIII. Vorkommen des Vitamins D 66)

Tabelle 54

Substanz	Klinische Einheiten pro g	Prophylaktische oder therapeutisch wirksame Menge
Lebertran	0,2 —2,0	
Butter	0,002—0,1	
Milch	0,001—0,002	8—12 ccm
Milch, UV.-bestrahlt	0,8	1 ccm
Hefe, UV.-bestrahlt	40	
Vigantol	50	
Frauenmilch		39 ccm
Olivenöl, Sesamöl; Sojaöl, Erdnußöl		Unwirksam
Dieselb. Öle, UV.-bestrahlt		0,1 ccm
Grüne Pflanzenteile		Fast unwirksam
Dass., nach UV.-Bestrahl.		10 g
Alfalfaheu, Klee		Nachweisbare Mengen Vitamin D; die 250 g entsprechende Menge ätherlöslicher Substanz — wirksam
Kohl, trocken; Tomate, trocken; Kartoffel		Äther-, Alkohol- oder Acetonauszug aus der 250 g entsprechenden Menge — unwirksam
Eigelb		0,05 g
Unverseifbares		0,0005 g
Eigelb, UV.-bestrahlt		0,002—0,003 g
Hefe, UV.-bestrahlt		0,25 mg

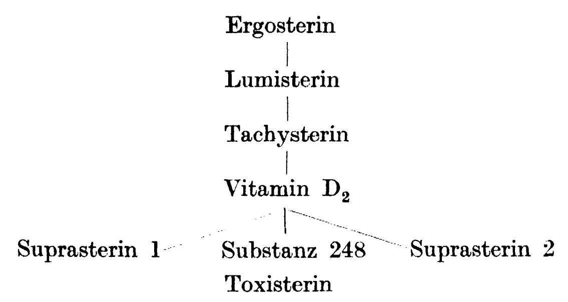
66) Scheunert im Handbuch der Lebensmittelchemie. Vitamine.

Sehr viel weiter verbreitet als das eigentliche Vitamin ist das Provitamin, Ergosterin. Fast alle Nahrungsmittel erlangen durch UV.-Bestrahlung starke antirachitische Wirkung. Die Angaben über den D-Gehalt der Milch schwanken stark. Die Ursachen liegen in der unzulänglichen Methodik, mit der manche Untersuchungen durchgeführt wurden. So bestimmt man z. B. den D-Gehalt der Milch aus der prophylaktischen oder therapeutischen Wirkung bei Zufütterung im Rattentest auf rachitogener Kost, ohne dabei zu bedenken, daß durch den Phosphatgehalt der Milch ein viel zu hoher Vitamin D-Gehalt vorgetäuscht wird.

IX. Die chemische Natur des Vitamins und Provitamins D

(siehe 1, 2, 66)

Das Provitamin D ist das Ergosterin. Es wird durch UV.-Bestrahlung in das wirksame Vitamin umgelagert. Die photochemische Umwandlung verläuft nach Windaus in folgenden Stufen:



Bei der UV.-Bestrahlung bildet sich zunächst Lumisterin, das rechtsdrehend ist und ein ähnliches Absorptionsspr̈ektrum hat wie Ergosterin. Bei weiterer Bestrahlung wandelt sich dieses in Tachysterin um, das antirachitisch unwirksam, aber stark toxisch ist. Tachysterinacetat liefert mit Citraconsäureanhydrid ein kristallisiertes Anlagerungsprodukt. Bei Überbestrahlung entstehen die beiden rechts- bzw. linksdrehenden Suprasterine. Die Art und Menge der Umwandlungsprodukte ist abhängig von der Wellenlänge des UV., von der Dauer der Bestrahlung, vom Lösungsmittel usw. Die beste Vitaminausbeute ergibt eine Bestrahlung in Benzol mit dem unfiltrierten Licht des Magnesiumfunkens, wenn die Umwandlung des Ergosterins 50% nicht übersteigt.

Die zunächst isolierte Substanz — Vitamin D_1 — erwies sich bei näherer Untersuchung als nicht einheitlich. Sie besteht aus 1 Molekül Lumisterin und 1 Molekül Vitamin D_2. Vitamin D_2 ist das reine antirachitische Vitamin. Die Abtrennung der Begleitsubstanzen war außerordentlich schwierig.

Die chemische Konstitution des Vitamins D ist nicht völlig aufgeklärt. Es ist wie alle durch die UV.-Bestrahlung entstehenden Umwandlungsprodukte ein Isomeres des Ergosterins. Bei der Bestrahlung findet eine Umlagerung statt, die die Gestalt der Moleküle so verändert, daß sie im Kristall oder monomolekularen Film nicht so nahe zusammenrücken können wie beim Ergosterin.

Die Frage, ob das aus Ergosterin künstlich durch UV.-Bestrahlung gebildete Vitamin mit dem in der Natur vorkommenden identisch ist, wird verschiedentlich

bezweifelt, da 1. zwischen beiden in der Wirkung bei Hühnchenrachitis Diskrepanzen bestehen und da 2. das Verhalten bei der Verseifung verschieden ist (s. 69)). Umstritten ist weiter die Herkunft des Vitamins im Lebertran (Zufuhr mit der Nahrung ?, Synthese im Fischorganismus ?). Nachgewiesen wurde die Unfähigkeit des Dorsches, Ergosterin in Vitamin D umzulagern. Bewiesen wurde ferner die Bildung des Vitamins D bei der Dunkelkeimung ohne Einwirkung von Licht.

X. Eigenschaften des Vitamins D und des Ergosterins

(l. c. 1—3 und 66)

Tabelle 55

	Vitamin D	Provitamin
Wirksamkeit . . .	0,015—0,02 γ pro die im Schutzversuch	Unwirksam
Löslichkeit	Aceton, Chloroform, Benzol, Petroläther, Alkohol	Dass.
Temperaturbeständigkeit . .	UV.-bestrahlte Substanzen verlieren selbst bei Kochen und Backen nicht die Wirksamkeit. Im Lebertran bleibt das Vitamin bei 100° nach 12—20 Stunden erhalten	
Oxydationsbeständigkeit . .	Erheblich. Bei Durchlüftung von Lebertran (100°, 12—20 Stunden) keine Zerstörung	
Verseifung	Zerstört nicht (s. aber S. 144)	Dass.
Hydrierung	Mit Pt-Katalysator ohne zerstörende Wirkung	
Digitonin	Nicht gefällt	Gefällt
Säurebeständigkeit .	Bei Kontakt mit Mineralsäuren langsam zerstört	
Besondere Eigenschaften . .	Durch nitrose Gase zerstört; nicht zerstört durch H_2O_2, H_2S, SO_2, Formaldehyd	
Bei Tierversuchen zu beachten . . .	Ölige Lösungen des Vitamins zeigen bei Zimmertemperatur nach 16 Monaten eine Abschwächung der Wirksamkeit	

XI. Methoden der Anreicherung des Vitamins D

Die Anreicherungsmethoden des Vitamins D sind namentlich für die Prüfung solcher Substanzen von Bedeutung, die das Vitamin D nur in kleinen Konzentrationen enthalten und daher nicht direkt im Tierversuch verfüttert werden können.

Aus Fetten oder Ölen kann das Vitamin durch Verseifung gewonnen werden. Man geht dabei in derselben Art und Weise vor, wie bei der Gewinnung des Vitamins A aus dem Unverseifbaren der Trane. Eine bewährte Verseifungsmethode ist die beim Vitamin A beschriebene von Markus. Die unverseifbaren Substanzen werden für den Tierversuch in Öl gelöst ausgewertet. Aus pflanzlichen Stoffen, z. B. Keimen, kann das Vitamin durch Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform gewonnen werden. Auch eine Aceton-Petrolätherextraktion führt zum Ziel.

Zucker hat aus Lebertran das Vitamin in einer 1000fachen Anreicherung durch Extraktion mit 95%igem Alkohol, Verseifung und Extraktion der Seifen mit Aceton erhalten. Die Reindarstellung aus Lebertran ist nicht gelungen. Dagegen beschreibt Ender 68) in letzter Zeit Verfahren, die eine

68) Ender, Z. f. Vitaminforschg 2, 241 (1933); 3, 160 (1934).

erhebliche Anreicherung des Vitamins D aus Leberölen des Thunfisch ermöglichen. Das Öl wird zunächst mehrmals mit alkoholischer Kalilauge verseift. Der unverseifbare Anteil in heißem Methanol aufgenommen und auf — 10° abgekühlt. Die Sterine fallen dabei zum größten Teil aus. Durch weitere Abkühlung auf — 70° kann die Fraktion von weiteren inaktiven Bestandteilen befreit werden. Nach Einengen der Methanollösung auf $^1/_3$ des Volumens und erneuter Abkühlung auf — 70° fallen weitere Begleitstoffe. Das Vitamin bleibt in Lösung. Nach Verjagen des Methanols bleibt als Rückstand ein tiefrotgelbes Öl. Durch Veresterung mit Phthalsäureanhydrid in Pyridin (3 Tage) erhält man Phthalsäureester, von denen die protolätherlöslichen nach dem Verseifen aktiv sind. Die erhaltenen entsprechenden einwertigen Alkohole wurden zwecks weiterer Reinigung einer fraktionierten Destillation bei 0,01—0,03 mm unterworfen. Die Hauptmenge des Vitamins geht bei Temperaturen unter 150° über. Ein anderer Reinigungsweg besteht in der fraktionierten Ausfrierung der Phthalestersäuren in Petroläther. Die in einer Kältemischung ausfallende Fraktion ist inaktiv. Die vitaminhaltige Fraktion fällt bei — 70°. Durch Kombination der Methoden gelang es zu Präparaten zu kommen, die schon in Tagesdosen von 0,03—0,04 γ stark antirachitisch wirksam waren.

Ohne auf die Streitfrage einzugehen, ob das natürlich vorkommende Vitamin D mit dem künstlich aus Ergosterin dargestellten identisch ist, muß hier darauf hingewiesen werden, daß das Vitamin D aus Pflanzenstoffen durch die Verseifung zerstört wird, während das aus Tran und Ergosterin dargestellte erhalten bleibt **69)**. Rygh hat neuerdings den fehlenden Vitaminanteil, der bei der Verseifung der Substanzen aus Butter, Heu oder Kuhleber nicht in die unverseifbare Fraktion geht, in den isolierten freien Fettsäuren nachgewiesen **69a)**. Bei Verseifung von Lebertran und Ergosterin geht die gesamte Wirksamkeit in die unverseifbare Fraktion.

XII. Darstellung des Ergosterins aus Hefe nach Windaus

2 Liter Preßhefe werden mit 2 Liter 95 %igem Alkohol in einer Schale gut verrührt und die Lösung in einen 5 Liter-Rundkolben überführt. Man versetzt mit 400 g KOH in konzentrierter wässeriger Lösung und kocht 3 Stunden auf dem Wasserbad. Die Mischung wird abgesaugt. Der Rückstand wird nochmals mit Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Filtrate werden auf die Hälfte eingeengt und mit demselben Volumen Wasser verdünnt. Die Lösung wird dreimal im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt. (Man füllt den Trichter vollkommen bis zum Rand mit Äther, um Emulsionsbildung zu vermeiden.) Die gelbe ätherische Lösung wird mit Salzsäure gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Der scharf abgepreßte Heferückstand wird mit Äther im Soxleth erschöpfend extrahiert, der Äther wie oben getrocknet und die gesamten ätherischen Lösungen auf dem Wasserbad verjagt. Als Rückstand erhält man ein hellgelbes, nach Honig riechendes Öl, das erstarrt. Man löst in möglichst wenig Petroläther (siedend) und kühlt in einer Kältemischung. Es erscheinen weiße Kristalle, die mit kaltem Petroläther gewaschen werden. Die Substanz wird aus Alkohol mehrmals umkristallisiert. Man erhält feine silbrig glänzende Kristalle, die vor Licht geschützt werden müssen, da sie sich sonst verfärben. Ausbeute aus 10 kg Preßhefe etwa 15 g. Die Substanz kann weiter über den Essigester gereinigt werden. F. des reinen Ergosterins liegt bei 180—181°.

---

69) Kon-Booth, Biochemic. J. 27, 1189, 1302 (1933).
69a) Rygh, Z. f. Vitaminforschg 3, 165 (1934).

XIII. Die Darstellung des kristallisierten Vitamins D nach Windaus c. s. 70)

25 g reinstes, aus Benzol-Alkohol umkristallisiertes und im Vakuum bei 80° getrocknetes Ergosterin werden in 500 ccm Benzol (Kahlbaum, zur Mol.-Gew.-Bestimmung) gelöst und in einer rotierenden Quarzwalze (s. Original) 12 Stunden lang mit dem Gesamtlicht des Magnesiumfunkens bestrahlt.

Nach 12 Stunden sind 60% des Ergosterins umgewandelt. Die bestrahlte Lösung wird bei 30—40° im Vakuum eingeengt (Spezialapparatur zum Arbeiten unter Luftabschluß), der Rückstand mit 500 ccm Methylalkohol (der unter Durchleiten von Kohlendioxyd ausgekocht wurde) bei 35—40° digeriert. Die Lösung wird auf —10° abgekühlt und das ausfallende Ergosterin abfiltriert. Das Filtrat wird mit 3 g Digitonin versetzt und zur Trockne gebracht (35°, Vakuum).

Der Rückstand wird mit 650 ccm Petroläther (niedrig siedend) 12 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Unlösliches Ergosterindigitonid und überschüssiges Digitonin werden entfernt und mit Petroläther ausgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum auf 50 ccm eingeengt.

Man versetzt diese Lösung in einem Rohr mit 7,5 g Citraconsäureanhydrid in absolutem peroxydfreiem Äther. Die Lösung muß klar sein. Das Rohr wird zugeschmolzen und 7 Tage bei Zimmertemperatur aufgehoben.

Nach dieser Zeit wird die Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand in 120 ccm 10%iger methylalkoholischer Kalilauge bei 35° gelöst. Die Lösung wird sofort gekühlt und zur vollständigen Verseifung 12 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die alkalische Lösung wird mit dem 4fachen Volumen ausgekochtem Wasser versetzt und mit reichlich Petroläther ausgeschüttelt (3mal). Das Vitamin findet sich im Petroläther. Das Lösungsmittel wird mit ausgekochtem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Aceton (siedend) gelöst und die Lösung im Eisschrank der Kristallisation überlassen. (Am besten mit D_2-Kristallen impfen.) Man kühlt vor dem Abfiltrieren mehrere Stunden auf —20° und saugt die Kristalle auf einer gekühlten Nutsche ab. Nachwaschen mit Aceton von —20°, dann mit Mischungen von Aceton-Methylalkohol und zuletzt mit gekühltem Methylalkohol. Die Ausbeute beträgt etwa 5 g.

Das Vitamin E 1)

Die Entdeckung von Evans und Mitarbeitern, daß es ein fettlösliches Vitamin gibt, das für Befruchtung, Schwangerschaft und Laktation von größter Bedeutung ist, konnte durch die Arbeiten von Sure und Matill bestätigt werden. Das Vitamin E, auch Antisterilitätsvitamin genannt, ein Name, der nicht so ganz berechtigt ist, da auch bei Vitamin A-Mangel Sterilitätserscheinungen auftreten, spielt für den Menschen nicht die überragende Rolle wie andere fettlösliche Ergänzungsstoffe. Das hat wohl seinen Grund darin, daß das Vitamin E in der Natur, namentlich in der Pflanzenwelt, sehr viel weiter verbreitet ist als diese und vor allem nicht so leicht zerstört wird wie z. B. das A-Vitamin.

70) Windaus-Linsert-Lüttringhaus-Weidlich, Ann. Chem. 492, 229 (1932).

1) Evans-Burr, Calf. Univers. Memoires 8 (1927); J. amer. med. Assoc. 89, 1587 (1927); 88, 1462 (1927); Amer. J. Physiol. 85, 149 (1928); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 25, 41 (1927).

Die Hauptschwierigkeit beim Studium des Vitamins E ist, daß beim Tier ein Mangel nicht, wie wir es sonst bei den Avitaminosen gewohnt sind, schon sehr bald zu typischen Ausfallserscheinungen führt, sondern sich vielleicht erst in der zweiten oder dritten Generation bemerkbar macht. Dieser Umstand ist natürlich besonders fühlbar bei der Auswertung des Vitamins, weil ein Testversuch oft Monate oder Jahre dauert.

I. Die Erscheinungen der Avitaminose E beim Tier (l. c. 1)

Die Erscheinungen des E-Mangels sind bei den Geschlechtern insofern verschieden, als bei männlichen Tieren an den Sexualorganen schwere degenerative Veränderungen beobachtet werden, während der E-Mangel beim weiblichen Tier nur eine Schädigung der Frucht bewirkt und auf den mütterlichen Organismus ohne Einfluß ist. Das nicht gravide Tier wird überhaupt nicht geschädigt.

a) Die Erscheinungen der E-Avitaminose beim männlichen Tier treten frühestens nach 12wöchentlicher E-freier Fütterung auf. Die Spermien verlieren zuerst ihre Beweglichkeit, verändern ihre Gestalt und verklumpen. Die Samenkanälchen mit den Spermatogenien und Spermatozyten atrophieren und nekrotisieren. Die Männchen sind nach 5 Monaten steril. Später werden auch die Spermatidenkerne und Spermien angegriffen. Es kommt zur Riesenzellenbildung und Verflüssigung. Nach 8—9 Monaten sind die Spermatozoen verschwunden. Nach 13—14 Monaten tritt vollkommener Verlust jeden sexuellen Interesses ein. Sekundär kommen noch Veränderungen an der Prostata hinzu. Das Haarkleid wird eunuchoid. Die Haare werden seidig und wollig und verlieren ihre Elastizität.

Während der erste Zustand durch rechtzeitige Vitaminzufuhr noch heilbar ist, wird die Erkrankung in den späteren Stadien irreparabel.

b) Die Erscheinungen am weiblichen Tier sind von denen am Männchen vollkommen verschieden. Das Weibchen bleibt stets konzeptionsfähig. Ovulation, Befruchtung und Eiimplantation bleiben normal. Der östrische Zyklus ist ungestört. Der E-Mangel wirkt sich nur an Plazenta und Embryo aus.

Bei Beginn der E-Avitaminose nimmt die Gravidität noch einen normalen Verlauf (initial fertility). Mitunter wird auch schon ein Teil der Jungen totgeboren. Die Muttertiere verweigern oft die Aufzucht der lebendgeborenen. Bei der zweiten Gravidität gibt es nur wenige, meist totgeborene Junge, bei der dritten werden die Feten resorbiert. Die Plazenta fällt einer Koagulationsnekrose anheim und wird ebenfalls resorbiert. Bemerkenswert ist das Auftreten von Deziduatumoren.

Die Avitaminose ist in jedem Stadium reparabel. Die Schwangerschaft nimmt einen normalen Verlauf, wenn täglich kleine Dosen eines Vitamin E-Konzentrats (von Weizenkeimöl etwa 75 mg intraperitoneal) gegeben werden oder wenn man eine einmalige große Dosis (1,1 g Weizenkeimöl) innerhalb 5 Tage nach der Befruchtung verabreicht.

c) Erscheinungen des Vitamin E-Mangels außerhalb der Sexualsphäre. Neben den beschriebenen Erscheinungen des Mangels an Vitamin E berichtet Evans über eine Wachstumswirkung des Vitamins, die sich bei Ratten erst nach einem Alter von etwa 90 Tagen bemerkbar macht. Ausgesprochen wird sie aber nach 8—12 Monaten. Das bessere Wachstum der mit Vitamin E gefütterten Tiere wurde auch bei Kastraten beobachtet. Weiter beeinflußt das Vitamin E die Laktation. Man dis-

kutiert sogar die Existenz eines besonderen galaktogenen Faktors, der vom Antisterilitätsfaktor verschieden sein soll.

Spastische Lähmungen und Paralyse der Jungen E-frei ernährter Mütter beobachtete Evans. Das Auftreten von Deziduatumoren wurde bereits erwähnt. Die pathologischen Veränderungen der Avitaminose E wurden besonders von Evans-Burr, Mason und McCarrison studiert. Nach Pappenheimer sind sie nicht auf die Sexualsphäre beschränkt, sondern bestehen in einer allgemeinen Dystrophie des gesamten Muskelsystems. Die Avitaminose beginnt mit einer wachsigen oder hyalinen Nekrose der Muskelfasern, die von einer Proliferation der Muskelnuklei und einer Degeneration der Muskelzelle gefolgt ist. Goetsch, der die Erscheinungen der Avitaminose E am Meerschweinchen studierte, fand, daß die Muskeln der Schenkel und des Abdomens teilweise angegriffen waren. Sie erschienen blaß, atrophiert und zeigten eine gelbliche Verfärbung, die sie von gesunden deutlich unterschied. Mitunter waren sie merkwürdig gestreift, wie solche mit Fettinfiltration. In zwei Fällen waren deutliche Hämorrhagien vorhanden. Manchmal hatten die Muskeln ihre Reizbarkeit eingebüßt. Histologische Untersuchungen wurden besonders von Zagami 2) angestellt. Auch Juhasz und Schäffer 3) berichten eingehend darüber.

II. Die Methoden zur biologischen Auswertung des Vitamins E

Die Testmethoden auf Vitamin E sind durch die Länge der Versuchsdauer außerordentlich kompliziert. Der Nachweis des Vitamins beruht auf der Verhütung oder Heilung der Mangelsymptome.

A. Die Haltung der Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere weicht nicht wesentlich von den schon beschriebenen Methoden ab. Man verwendet am besten Ratten im Alter von 5—6 Wochen, die eine der folgenden E-freien Kostmischungen erhalten. Die erste Trächtigkeit tritt, wenn man nicht eine absolut E-freie Kost verfüttert, zur gewöhnlichen Zeit mit lebenden Jungen ein. Sie werden auch häufig noch großgezogen. Eine zweite Trächtigkeit mit Austragen der Jungen kommt fast nie mehr vor.

Bei jeder Trächtigkeit der Ratten steigt die Gewichtskurve in bekannter Weise an. Bei den E-frei ernährten Tieren ist das aber nur bis etwa zur Mitte der Schwangerschaft der Fall, da dann die Embryonen absterben und resorbiert werden. Die Kurve fällt langsam auf den Ausgangswert zurück. Das ist ein fast untrügliches Zeichen einer Resorptionssterilität.

Bei Prüfung auf Resorptionssterilität geht man so vor, daß man die zu untersuchenden Weibchen mit gesunden normal ernährten Männchen, deren Fruchtbarkeit an normalen Weibchen kontrolliert wird, zusammenbringt und nach einigen Stunden am Vaginalausstrich untersucht, ob ein die Kopulation beweisender Vaginalpfropf mit beweglichen Spermien vorhanden ist. Von da ab wird die Gewichtskurve registriert und ihr Anstieg als Zeichen der Gravidität bewertet.

2) Zagami, Ber. ges. Physiol. 73, 266 (1933). — Verzár, Z. f. Vitaminforschg 1932, 116.
3) Juhasz c. s., Virchows Arch. 268, 834 (1932).

B. Vitamin E-freie Diäten

Nr. 1. Evans-Burr:

Casein, gereinigt	18 %
Kornstärke	54 %
Schweinefett	15 %
Milchfett	9 %
Salzmischung	4 %

Dazu Trockenhefe 0,4—0,6 g pro Tag/Tier

Die Diät ist nicht absolut E-frei, da der erste Wurf Junge noch am Leben bleibt. Wenn das Milchfett weggelassen wird, leben von den ersten Würfen noch etwa 5 %. Die Herstellung geschieht durch Zusammenkneten der fein gepulverten Bestandteile.

Nr. 2. Evans-Burr:

Die Diät stellt eine Modifikation der ersten dar. Sie besteht aus:

Casein	18 %
Stärke, gekocht und getrocknet	54 %
Schweinefett	19 %
Milchfett	5 %
Salzmischung	4 %

Dazu Hefe 0,4—0,5 g pro Tag/Tier

Nr. 3. Evans-Burr, verbesserte Diät Nr. 232:

Casein	32 %
Stärke	40 %
Schweinefett	22 %
Lebertran	2 %
Salzmischung nach McCollum 185	4 %

Hefe wie bei 2

Nr. 4. Evans-Burr:

Casein nach van Slyke	50 Teile
Zucker aus 80 %igem Alkohol, krist.	150 Teile
Salzgemisch 185	8 Teile

Dazu Wasser (dest.) ad libitum, enthaltend eine Spur KJ. Die Tiere erhalten pro die 2—3 Tropfen Lebertran und 700—1000 mg Hefe.

Nr. 5. Evans Nr. 256:

Casein, extrahiert	24 %
Getreidestärke	72 %
Salzmischung	4 %

zu je 5 kg dieser Mischung ferner:

Eisenchlorid in Äther	1 g
Trockenhefe	4 g
Lebertran	6 g

Das Salzgemisch besteht aus:

Kochsalz	65
Magnesiumsulfat	159,6
Natriumphosphat, sek.	104,1
Monocalciumphosphat	162
Mononatriumphosphat	286,2
Ferricitrat	35,4
Calciumlactat	390

Die Kostform ist heute die meistgebrauchte für Vitamin E-Untersuchungen.

Nr. 6:

Casein, gereinigt	25 %
Salzmischung	4 %
Agar-Agar	2 %
Lebertran	2 %
Dextrin	66,6 %
Hefevitamin	0,4 %

Nr. 7. Waddell-Steenbock 4):

Die Diät nach Waddell-Steenbock stellt eine Modifikation der Steenbockschen Zuchtdiät dar, die durch Zusatz von Eisenchlorid für Zwecke des Vitamin E-Versuchs dienstbar gemacht wurde.

Mais, gelb	71,5 %
Casein, rein	5 %
Leinsamenmehl	15 %
Alfalfamehl	2 %
Knochenasche	1 %
Kochsalz	0,5 %
Butterfett	5 %

Die fein gemahlenen Bestandteile der Kost werden mit Eisenchlorid behandelt, derart, daß zu

98,8 Teilen der Mischung 1,2 Teile Eisenchlorid in Äther gegeben werden.

5 Teile der so entstehenden Mischung werden wieder mit 1 Teil Vollmilchtrockenpulver versetzt und verfüttert.

C. Die einzelnen Testmethoden

1. Die Methode von Evans und Mitarbeiter

Für den kurativen Test auf Vitamin E werden Ratten, an denen man nach E-freier Fütterung eine Resorptionssterilität festgestellt hat, benutzt. Man bringt sie mit gesunden Männchen zusammen und gibt am Tage der Kopulation eine einmalige Dosis der zu untersuchenden Substanz. Dann wird der Ablauf der Gravidität verfolgt. Man kann die zu untersuchende Substanz auch täglich geben. Die Verabreichung kann peroral oder parenteral erfolgen. Die Substanz darf nicht mit dem Futter vermischt werden. Man prüft stets im Parallelversuch ein E-Konzentrat bekannter Wirksamkeit und bezieht die Wirkung der unbekannten Substanz auf diesen Standard.

Im prophylaktischen Test wird von Anfang an die unbekannte Substanz zugelegt. Am besten werden vier weibliche Tiere mit einem männlichen (Gewicht 35—45 g) zusammengebracht. Zwei solcher Gruppen erhalten die Zulage, zwei andere bleiben unbehandelt und dienen als negative Kontrolle. Zwei weitere Gruppen erhalten eine bestimmte Dosis des Standards. Eine wirksame Zulage muß die Erscheinungen der Resorptionssterilität verhüten können.

2. Der Test von Olcott-Matill 5)

Die Methode ist eine modifizierte Evanssche. Weibliche Ratten mit einem Gewicht von 30—40 g werden auf eine E-freie Kost gesetzt (Nr. 4), bis sie ein Gewicht von 150 g und ein Alter von 70—90 Tagen erreicht haben. Dann

4) Waddell-Steenbock, J. of biol. Chem. 80, 431 (1928).
5) Olcott c. s., J. of biol. Chem. 104, 426 (1934).

untersucht man täglich den Vaginalabstrich. Beim Eintritt des Östrus werden die Tiere mit gesunden männlichen gepaart. Es erfolgt auf der Kost meist eine typische Resorptionssterilität.

Wenn danach der Östrus wieder auftritt, wird erneut gepaart. Nach erfolgtem Nachweis eines die Kopulation beweisenden Pfropfes im Vaginalabstrich mit beweglichen Spermien entfernt man aus den Käfigen das Futter und gibt 10—12 Stunden später die zu untersuchende Substanz. Man verfolgt weiter auf der E-freien Kost den Verlauf der Gravidität (Gewichtskurve!).

Werden Junge geboren, so reduziert man den Wurf auf 6 und läßt sie bei der Mutter, bis sie ausgewachsen sind. In diesem Falle muß das Muttertier erneut eine Resorptionssterilität durchmachen, bis es für die zweite Auswertung brauchbar ist. Erzielte man aber mit der verfütterten Substanz keine Verhütung der Resorptionssterilität, kann die nächste Substanz anschließend am selben Tier ausgewertet werden.

Durch einmalige Verabreichung einer wirksamen Substanz kann man den Ablauf der ersten und zweiten Schwangerschaft normal gestalten, nicht aber die dritte. Es besteht keine Parallelität zwischen dem E-Angebot und der Zahl oder Lebensdauer der Jungen. Als positiv wird ein Versuch lediglich nach dem Ablauf der Gravidität gewertet.

Bei der Prüfung auf E-Wirksamkeit muß im Parallelversuch stets ein E-Standardpräparat mitgewertet werden, auf das man die unbekannte Substanz bezieht.

III. Vorkommen des Vitamins E

Tabelle 56

Substanz	Relative E-Aktivität = 100 durch die zum normalen Graviditätsablauf erforderliche Menge	Tägliche prophylaktische Dosis
Gemüse, frisch, Salat	40	2,5 g
Gemüse, trocken		0,25 g
Öl durch Ätherextraktion aus Trockengemüse		23 mg
Alfalfaheu		0,6 g
Brunnenkresse	Über 50	
Erbsen	25	
Erdnüsse, roh	100	
Weizenkeime, getrocknet	400	250 mg
Weizenkeimöl		75 mg
Hefe	Fast unwirksam	5 g
Rindsmuskel	20	
Pankreas, Milz	Etwas wirksamer als Muskel	
Leber	10	
Plazenta	25—100	
Hypophysenvorderlappen	25—100	
Schweinefett	20	
Eidotter	17	⅓ Eigelb

IV. Speicherung des Vitamins E

Schon die Erscheinung der „initial fertility" deutet darauf hin, daß eine Speicherung des Vitamins E in erheblichem Umfang stattfindet. Die Speicherungsstätten sind Muskel, Fettgewebe und Leber. Eine besonders bevorzugte Speicherung scheint nicht vorzuliegen. Der Aufbrauch findet ständig statt, Muskelgewebe E-frei ernährter Ratten ist E-arm.

V. Eigenschaften des Vitamins E

Tabelle 57

Aussehen des bisher reinsten Präparats	Orangegelbes viskoses, bei 0⁰ erstarrendes Öl, im Vakuum unzersetzt destilliert, vorläufige Formel $C_{36}H_{64}O_2$, Sterinreaktionen negativ.
Löslichkeit	Löslich in Äther, Benzol, Aceton, konzentriertem Alkohol, unlöslich in wäßrigem Alkohol, Wasser.
Hitzestabilität	Erheblich, verträgt 2stündige Erhitzung auf 155^0 ohne Verlust der Wirksamkeit. Im Vakuum bei $250—255^0$ stabil.
Oxydationsempfindlichkeit	Gegen Luftsauerstoff erheblich resistent. Ranzige Fette, Ölsäure usw. können zersetzend wirken (Schweineschmalz). Permanganat zerstört.
Alkalistabilität	Verträgt Verseifung ohne Verlust der Wirksamkeit.
Säurestabilität	Gegen 20%ige Salzsäure 34 Stunden lang bei Raumtemperatur beständig. Essigsäureanhydrid zerstört.
Zerstörende Agenzien . . .	UV.-Bestrahlung, Bromierung, Behandlung mit Eisenchlorid in ätherischer Lösung.

Nach neueren Untersuchungen (l. c. 5) verträgt die Substanz Benzoylierung und Acetylierung ohne Verlust der Wirksamkeit. Hydrierung schädigt nicht. Die Unempfindlichkeit gegen Oxydation soll auf der Anwesenheit einer schützenden Substanz beruhen, die das Vitamin in die reinsten Fraktionen hinein begleitet. Es ist ein Phenol der Formel $C_{13}H_{14}O_5$. Die chemische Natur des Vitamins ist unbekannt. Euler und Klussmann wiesen in den reinsten Präparaten Xanthophyll nach 6). Olcott-Matill konnten aber zeigen, daß ihr reinstes Präparat frei davon ist. Auch Bowden 7) konnte xanthophyllfreie Präparate gewinnen.

VI. Darstellung Vitamin E-haltiger Konzentrate

A. Methode von Evans und Burr

Evans und Burr verseiften Weizenkeimöl und erhielten etwa 5% Unverseifbares. Das Unverseifbare wurde mit kaltem Pentan und dann mit heißem Methylalkohol extrahiert. Aus der kalten Methylalkohollösung scheiden sich Kristalle ab, die in Petroläther gelöst mit Digitonin gefällt werden. Dabei gehen die Sterine in den Niederschlag. Der Rest wird nochmals mit 20%iger heißer Kalilauge verseift und die Digitoninfällung wiederholt. Man erhält schließlich ein Öl, das schon in Dosen von 5—10 mg pro Tag für den Ablauf einer normalen Schwangerschaft genügt und das im Vakuum bei $200—233^0$ unter 5 mm unzersetzt destilliert. Die Ausbeute beträgt 0,25% des Weizenkeimöls. Der Darstellungsprozeß geht in allen Einzelheiten aus folgender Tabelle hervor:

6) Euler c. s., Svensk. Kem. Tidskr. 45, 132 (1933); Biochem. Z. 256, 11 (1932).
7) Bowden-Moore, Nature (Lond.) 1933, 1, 512.

Tabelle 58. **Outline of Fractionation of 6 Kilos of Wheat Germ**

6 kilos wheat germ

↓

Extracted with U.S.P. ether in Soxhlet

↓	↓
Ether extract. Active. Yield: 600 grams 10%	Ether-insoluble residue. Inactive

↓

Saponified in the cold with 20% alcoholic KOH

↓	↓
Nonsaponifiable matter (N.S.M.) Yield: 5%. Contains all the active material	Soaps and glycerol. Inactive

↓

Crystallized from cold pentane

↓	↓
Pentane-soluble red oil. Yield: 33% of the N.S.M. Contains all the active material	Pentane insoluble solids. Sitosterol Yields: 66% of N.S.M. Inactive

↓

Extracted with hot MeOH

↓	↓
Hot methyl alcohol solution. Active	Methyl alcohol insoluble residue. Inactive. Yield: 3% of N.S.M.

↓

Crystallized from cold MeOH

↓	↓
Cold MeOH solution. Active	Precipitate from cold MeOH. Almost entirely inactive. Yield: 10% of N.S.M.

↓

Distributed between dilute MeOH and petroleum ether

↓	↓
Petroleum ether soluble. Active Yield: 13% of N.S.M.	Dilute MeOH soluble. Inactive. Yield: 4% of N.S.M.

↓

Sterols precipitated by digitonin

↓	↓
Sterol-free orange oil. Yield: 2—3 grams. Active.	Sterols from digitonide. Inactive

↓

Refluxed in hot 20% alcoholic KOH

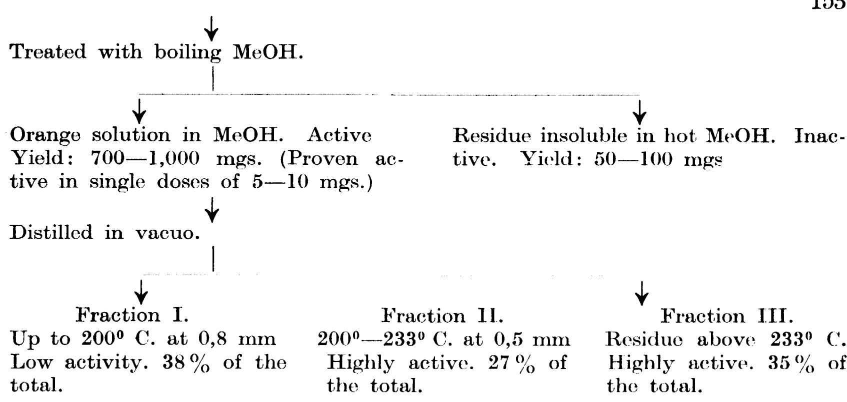
↓	↓
N.S.M. Contains all of the active material	Fatty acids. Inactive

↓

Sterols again precipitated by digitonin

↓	↓
Sterol-free oil. Active	Sterols. Inactive

↓



B. Methode von Olcott-Matill

Die ersten Fraktionen werden aus Weizenkeimöl nach Evans dargestellt. Das Weizenkeimöl wird durch Ätherextraktion im Soxleth aus getrockneten Weizenkeimen gewonnen. Man verseift zunächst das Öl wie oben und extrahiert die mit Wasser verdünnte Seifenlösung mit Äther. Die ätherischen Lösungen werden nach Trocknung eingeengt. Der Rückstand wird in Petroläther gelöst, die ungelöst bleibenden Sterine abfiltriert und der Petroläther auf dem Wasserbad verjagt.

Der Rückstand wird heiß mit Methanol extrahiert, die Lösung abgehebert und der Rest noch zweimal mit Methanol behandelt. Die Methanollösungen werden gekühlt und von den ausfallenden Sterinen befreit. Der Methylalkohol wird im Vakuum entfernt.

Der nun verbleibende Rückstand wird im Vakuum destilliert. Die wirksame Fraktion geht bei 200—225° und 0,1 mm über. Sie ist wirksam in Dosen von 10 mg, einmalig verabreicht. Eine weitere Reinigung kann durch Kühlung einer Acetonlösung auf — 80° und Entfernung der ausfallenden Substanzen erfolgen. Die so erhaltene Substanz ist schon wirksam in einmaligen Dosen von 5 mg.

Olcott-Matill konnten weiter eine wirksame E-Fraktion aus grünem Gemüse gewinnen. Nach Extraktion der lipoidlöslichen Stoffe und Verseifung sowie durch fraktionierte Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln erhielten sie ein Öl, das im Hochvakuum destilliert wurde. Die wirksame Fraktion ging bei 190—220° und 0,1 mm über. Sie sichert den Ablauf einer normalen Gravidität bereits in einer Menge von 5—10 mg.

VII. Der Vitamin E-Bedarf

Für den Menschen ist die Notwendigkeit der E-Zufuhr nicht erwiesen. Ratten und Mäuse benötigen das Vitamin. Interessant ist die Beobachtung von Hill-Burdet 8), nach der die Bienen der Nahrung der Königin Vitamin E zusetzen, nicht aber dem Futtersaft der Arbeiterlarven. Eine Bienenlarve wird nur dann zur Königin, wenn sie ausreichend mit Vitamin E versorgt wird.

Untersuchungen über den E-Bedarf der Hühner hat Gard 9) mitgeteilt.

---

8) Hill c. s., Nature (Lond.) 2, 540 (1932).
9) Card, Poultry Sci. 8, 328 (1929).

VIII. Über die komplexe Natur des Vitamins E

Nach Martino 10) ist die Maniokwurzel als Quelle des Vitamins E für das männliche Tier ausreichend, nicht aber für das Weibchen. Es scheinen demnach zwei, im allgemeinen eng zusammen vorkommende verschiedene Faktoren vorzuliegen. Auch Euler schließt auf Grund seiner Absorptionsspektren, daß zwei voneinander verschiedene Vitamine E existieren. Weiter lassen die Untersuchungen von Zagami 11) über die teilweise Verhütung der Avitaminose E durch Kupfer und Zink auf eine komplexe Natur des Vitamins schließen. Neuerdings berichtet auch Grijns 12) über die dualistische Natur des Vitamins E.

Das fettlösliche Wachstumsvitamin 1), 2), 3)

Die Erscheinung, daß junge Ratten auf einer vollwertigen Kost, die sämtliche Vitamine enthält, anfangs gut gedeihen, aber das Wachstum nach einiger Zeit einstellen, wenn die Diät statt gewöhnlichem Casein ein Alkohol-Äther-extrahiertes Präparat enthält, hat zu der Annahme geführt, daß neben den bekannten fettlöslichen Vitaminen A, D und E noch ein weiteres vorkommt, das für das Wachstum von Bedeutung ist.

Ernährt man junge Ratten mit einer A-freien Diät, die als Eiweißquelle „Glaxo"-Casein, d. h. ein extrahiertes, vitaminfreies Casein enthält, bis sie aufhören zu wachsen, so tritt nach Zulage von Vitamin A als Lebertran oder Kresse kein Wachstum auf, obgleich die Kost nach den bisherigen Erfahrungen als vollwertig gelten sollte. Sobald man aber in der Diät das vitaminfreie Casein durch gewöhnliches ersetzt (Light white Casein vom British Droug House London) und nun Vitamin A zulegt, erfolgt normales Wachstum.

Im Light white Casein ist also eine Substanz vorhanden, die im hochgereinigten fehlt, und die anwesend sein muß zur Entfaltung der Wachstumswirkung des Vitamins A. Diese Erscheinung ist natürlich für den Test auf Vitamin A von größter Bedeutung, da man selbst nach Zulage wirksamer Dosen mit hochgereinigtem Casein keine Ausschläge bekommt (s. aber unter Vitamin A die gegenteiligen Befunde, S. 34).

Der Wachstumsstillstand ist nicht die einzige Folge des Fehlens der unbekannten Substanz. Es treten vielmehr schwere Degenerationserscheinungen hinzu. Die Ratten bleiben nicht nur im Wachstum zurück, sondern erreichen auch nie das Gewicht normaler Tiere. Sie werden spät geschlechtsreif und verweigern mitunter die Aufzucht ihrer Jungen. Die zyklischen Veränderungen an den Genitalorganen können fehlen. Männchen sind gegen die Avitaminose weit empfindlicher als Weibchen. Die neue Avitaminose hat also mit der E-Avitaminose gewisse Ähnlichkeiten. Auch zu der Fettmangelkrankheit, die durch Verfütterung fettfreier Diäten entsteht, scheinen Beziehungen vor-

10) Martino, Boll. Soc. Biol. sper. 8, 819 (1933).
11) Zagami, Ber. Physiol. 76, 462 (1932).
12) Grijns, Ber. Physiol. 74, 668 (1933).
1) Coward-Key-Morgan, Biochemic. J. 23, 695, 913 (1929).
2) Guha, Biochemic. J. 25, 931, 945 (1931).
3) Evans, J. of biol. Chem. 77, 651 (1928); 92, 615 (1931); 96, 143, 175, 165 (1932); Amer. J. Physiol. 99, 477 (1932).

zuliegen. Möglicherweise sind die Erscheinungen komplexer Natur und beruhen teilweise auch auf Mangel an ungesättigten Fettsäuren.

Das fettlösliche Wachstumsvitamin scheint auch für den B-Test gewisse Bedeutung zu besitzen, da eine Diät mit hochgereinigtem Casein selbst nach Zugabe von Hefe für das Wachstum nicht voll ausreichend ist. Erst bei Ersatz des Caseins durch weniger gereinigtes tritt Wachstum in normalem Umfang ein **3a)**.

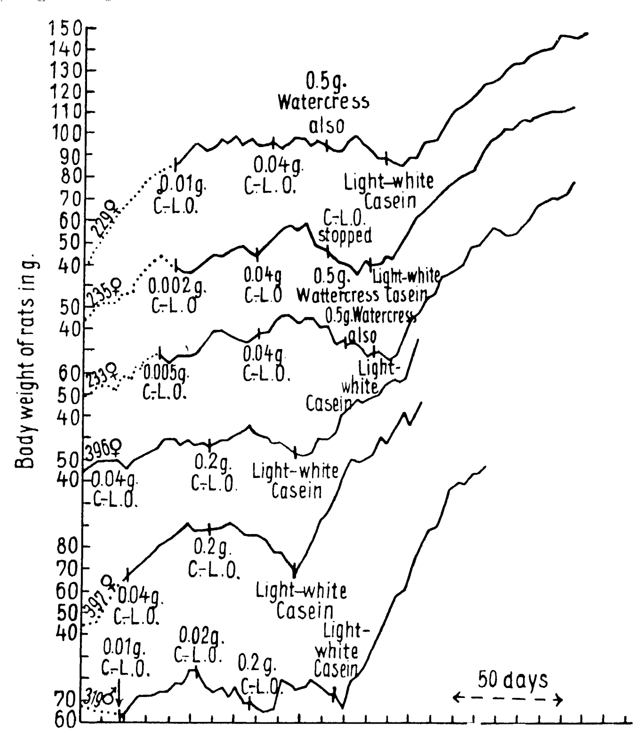


Abb. 66. Gewichtskurven einiger mit vitaminfreiem Glaxo Casein gefütterter Ratten. Die Gewichtszunahme hört trotz Zulage steigender Dosen Vitamin A und Wasserkresse auf und fängt erst nach Ersatz des Caseins durch Light white Casein an (C.-L. O. = Lebertran). (Nach Coward.)

Der Test auf das fettlösliche Wachstumsvitamin

Der Test wird an Ratten ausgeführt. Tiere mit einem Gewicht von 40 bis 50 g werden mit einer Kost, die folgendermaßen zusammengesetzt ist, ernährt:

Reisstärke, dextriniert	71 %
Vitaminfreies Casein „Glaxo"	15 %
Agar-Agar	2 %
Steenbocks Salzgemisch	4 %

Lebertran 2mal pro Woche je 5—6 Tropfen
B_2 als autoklavierte Hefe (Marmitextrakt) 0,4 g Marmit
B_1 als Konzentrat, etwa 8 Taubendosen pro Tag.
Statt B_1 und B_2 kann man auch Hefe verfüttern.

3a) Mapson, Biochemic. J. 27, 1061 (1933).

Auf dieser Kost wachsen sie zunächst normal, stellen aber dann in etwa 30 Tagen das Wachstum ein und verlieren nun regelmäßig an Gewicht. Jetzt gibt man eine große Dosis Vitamin A. Erfolgt Gewichtszunahme, so wartet man ab, bis das Gewicht wieder konstant wird und gibt dann nochmals Vitaman A. Wenn trotz A-Zugabe kein Wachstum erfolgt, sondern im Gegenteil Gewichtsverlust, gibt man die zu prüfende Substanz zu. Typische Gewichtskurven gehen aus Abbildung 66 hervor.

Vorkommen des fettlöslichen Wachstumsvitamins

Das fettlösliche Wachstumsvitamin kommt vor in Milch, Eigelb, Salat, Spinat, Gras, Muskel, Leber, Butter und Weizenkeimen. Nachstehende Tabelle gibt über die Wirkung einiger Substanzen, die auf Anwesenheit des neuen Vitamins geprüft wurden, Auskunft:

Tabelle 59

Substance	Dose tested	No. of rats used	Results
1. "Light-white casein" (B.D.H.) untreated, 4 different samples	15% of diet	40	Rapid growth in all but 3 rats, slow growth in these
	10% of diet	4	Good growth but less rapid than 15% was given
	5% of diet	4	No growth
2. "Crude casein" (B.D.H.)	15% of diet	4	1 died. 3 maintained weight for 75, 49, 30 days respectively*).
3. Dairy butter	0,5 g. daily	3	Maintained weight for 34 days
4. Fresh milk (London supply)	10 cc. daily	4	Rapid growth in all
5. Milk boiled for 15 mins.	10 cc. daily (= 15 cc. fresh)	4	Moderate growth in all
6. Lettuce—fresh	1 g. daily	7	Maintained weigth in 5 for 7—30 days. Fair growth in 2
	Ad lib., often 40—50 g. per rat per day	7, the same animals that had 1 g.	Good growth
7. Etiolated wheat shoots, 10 days old (grown under laboratory conditions)	15 g. daily	3	Slight growth
8. Dried grass clippings	5% of diet	3	Rapid growth in 2 rats Slow growth in 1 rat increased by raising amount to 10%
9. Fresh grass clippings	About 10 g. daily	2	Rapid growth

*) One of these rats was finally given "light-white-casein" to which it responded with rapid growth.

Substance	Dose tested	No. of rats used	Results
10. Extra dried yeast	10% of diet	14	No influence*)
11. Marmite	0,5 g. daily	13	Slight temporary increase in weigth in 5. Maintained weight in others**)
12. Autoclaved marmite	1,0 g. daily	3	No influence**)
13. Watercress	Ad. lib., about 10 g. daily	3	Slight increase**)
14. Ox muscle	1 g. daily	4	Good growth
	Ad. lib., 15—20 g. daily	4	Very rapid growth
Ox liver	1 g. daily	4	Very rapid growth
15. Wheat embryo	5%	3	Rapid growth in 2. Weight maintained in 1
	10%	3	Rapid growth
16. Wheat germ oil, sample 0	Up to 0,08 g.	6	No influence***)
	Up to 0,16 g.	4	1 maintained weight. 2 fair growth. 1 died
Wheat germ oil, sample 1	Up to 0,02 g.	3	No influence
	Up to 0,12 g.	3	No influence in 2. Fair growth in 1
Wheat germ oil, sample 2	0,12 g. daily	4	Fair growth in 3. Maintained weight in 1

Darstellung des fettlöslichen Wachstumsvitamins

Das Vitamin ist aus Casein darstellbar. Am besten wird getrocknetes Casein mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherrückstand enthält die gesamte Wirkung. Aus Weizenkeimlingen, die bei 105° getrocknet wurden, läßt sich das Vitamin durch Äther extrahieren (4malige heiße Extraktion). Man erhält im Ätherrückstand eine Substanz, die schon in Dosen von 0,16 g pro die den Bedarf deckt. Aus Weizenkeimen ist das Vitamin auch durch eine 6stündige Extraktion mit heißem 90%igem Alkohol in Lösung zu bringen.

Eigenschaften des Vitamins

Das fettlösliche Wachstumsvitamin wird durch Erhitzen auf 105° nicht zerstört. Selbst bei Ausdehnung der Erhitzung über 7 Tage tritt nur geringfügige Zersetzung ein. Das Vitamin ist löslich in Äther und heißem Alkohol, aber unlöslich in Wasser.

*) One of these rats was finally given "light-white casein" to which it responded with rapid growth.

**) Two of these rats were finally given "light-white casein" to which they responded with rapid growth.

***) One of these rats was finally given 10% wheat germ to which it responded with rapid growth.

Die wasserlöslichen Vitamine

Das Vitamin B_1 1), 2), 3)

Die Entdeckung Eijkmanns, daß Hühner bei Fütterung mit poliertem Reis an Polyneuritis erkranken, bildet den Anfang der Vitaminlehre. Der Name Vitamin, der von Funk für den fehlenden Ergänzungsfaktor vorgeschlagen wurde, ist inzwischen als Gruppenbezeichnung aller in der Nahrung vorkommenden lebenswichtigen Substanzen angenommen. Heute reihen wir das Antiberiberivitamin in die Reihe der wasserlöslichen B-Vitamine ein mit der Bezeichnung B_1.

I. Die Avitaminose B_1

1. Die Erscheinungen der Beriberi

Die klassische B_1-Avitaminose Ostasiens, die Beriberi, ist keine reine Form der Mangelkrankheit, sondern mitbedingt durch Vitamin B_4-Mangel und außerdem durch Infekte kompliziert. Die Haupterscheinungen der Beriberi sind Polyneuritis, Ödeme, seröse Ergüsse, Magen-Darmaffektionen und Herzinsuffizienz, beruhend auf spezifischer Wasserretention der Herzmuskelfasern.

2. Die Erscheinungen der experimentellen Avitaminose B_1 bei der Taube

Appetitnachlaß, Bewegungsunlust. Die B-arme Kost wird zunächst von der Taube gern genommen. Nach einigen Tagen sinkt aber die Kampflust der Tiere. Der Tanz der Männchen um die Weibchen hört auf. Die Tiere werden schläfrig und apathisch. Nach weiteren Tagen tritt Appetitnachlaß und Bewegungsunlust ein. Die Tiere machen einen traurigen Eindruck, putzen sich nicht mehr und sitzen aufgeplustert auf der Stange oder in einer Ecke und bewegen sich überhaupt nur, wenn sie gescheucht werden.

Verdauungsstörungen. Häufig treten Verdauungsstörungen auf. Der Kot wird schleimig, wasserhell, gelb. Die Tiere zeigen keine Mühe, sich davon zu reinigen. Es kommt zu einer Atonie des Kropfes, wobei der Inhalt liegen bleibt, weil die Kontraktionen aufhören.

Gewichtsverlust. Das Körpergewicht nimmt immer schneller ab, ebenso auch die Körpertemperatur. Werden die Tiere sich selbst überlassen, gehen sie unter Hungern zugrunde. Die Gewichtsabnahme beträgt etwa 2,5 % des Gewichts pro Tag.

Temperatursturz. Die kloakale Temperatur sinkt während der experimentellen B_1-Avitaminose von 39,8—43,2° auf 36,6—37,2° C.

Krämpfe. Bei Zwangsfütterung entwickelt sich die Beriberi in 10 bis 30 Tagen. Dann treten ziemlich unvermittelt typische Krämpfe auf, die mit einem starken Temperatursturz einhergehen. Störungen des Zentralnervensystems stehen im Vordergrund. Typische Stellung der Tiere: Rückbiegen des Kopfes bis auf den Rücken unter Anziehen der Beine. Die Erscheinungen können

1) Sherman c. s., The Vitamins. New York 1931.
2) Browning, The Vitamins. London 1931.
3) Beriberi in Stepp-György, Avitaminosen.

durch Beunruhigung der Tiere leicht hervorgerufen werden. Die Tauben gehen in diesem Zustand, wenn man sie unbehandelt läßt, in einigen Stunden unter schwerer Atemnot und Verstärkung der Krämpfe zugrunde. Zwangsfütterung bei Nachlassen des Appetits oder Fütterung von Kohlenhydrat beschleunigt den Ausbruch der Krämpfe. Bei Zwangsfütterung versuchen die Tiere den Reis durch Schüttelbewegungen aus dem Kropf zu entleeren. Man hat den Eindruck, daß sie Ekel vor Reis haben.

Der Verlauf der Taubenberiberi ist nicht immer so typisch. Dann gehen die Tiere unter Abnahme des Gewichts ein. Die Beine sind oft gelähmt, so daß Flügel und Schnabel zur Fortbewegung gebraucht werden. Abderhalden und Schaumann unterscheiden mehrere Formen der B_1-Avitaminose bei der Taube.



Abb. 67. Spastische Form der Taubenberiberi. (Nach Funk.)

Bei der **akuten Form** der Taubenberiberi (Abb. 67) beobachtet man zuerst eine Störung der Gehfähigkeit. Die Tiere können nur eine kleine Strecke normal gehen, dann tritt Ermüdung ein und die Flügel werden zu Hilfe genommen. Schließlich bleibt das Tier bewegungslos sitzen. Das Herz schlägt heftig, man hat den Eindruck, daß das Tier sich überanstrengt hat. Flugversuche werden nur sehr selten beobachtet. Nach einigen Tagen macht die Taube unkohärente Bewegungen mit dem Kopf. Schwingt man das Tier einige Male in der Luft, so läßt sich in diesem Stadium ein Krampf auslösen. Durch Kontraktion der Nackenmuskulatur wird der Kopf gegen den Rücken gezogen. Das Tier überschlägt sich und rollt wie eine Kugel. Im Laufe eines Tages tritt eine Atmungsstörung dazu. Die Taube reißt den Schnabel auf und geht unter Atemnot ein. Gewöhnlich tritt 12—14 Stunden nach Beginn der Erscheinungen der Tod ein.

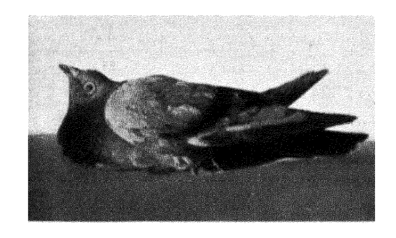


Abb. 68. Paralytische Form der Taubenberiberi.
Für Testversuche unbrauchbar. (Nach Funk.)

Der **chronische Typ** der Taubenberiberi ist in Abb. 68 gezeigt. Hier findet man die Tiere nach zweiwöchiger Fütterung eines Morgens im Käfig in einer Ecke sitzend. Sie bewegen sich nur ungern, vermögen sich zuerst aber aufzurichten. Nach einigen Tagen verlieren sie diese Fähigkeit auch und sitzen nun bewegungslos auf einem Fleck. Meist lebt das Tier einige Wochen und verendet an derselben Stelle. Selten geht diese Form in die spastische über. Für den Testversuch sind diese Tiere nicht zu brauchen.

Tiere des akuten Typs zeigen wieder verschiedene Erscheinungen. Bei manchen bleibt der spastische Zustand bis zum Tode bestehen. Bei anderen lösen sich die Krämpfe vorübergehend in kurzen Intervallen und kommen dann erneut wieder. Beiden Formen gemeinsam ist nur die Gewichtsabnahme.

McCarrison (s. l. c. 1) unterscheidet zwei Formen der Beriberi bei Vögeln: 1. Polyneuritis columbarum und 2. Beriberi columbarum, die verschieden sein sollen nach den Veränderungen im Nervensystem, den pathologischen Veränderungen usw. Die Untersuchungen wurden von anderer Seite bestätigt. Besonders auffällig sind bei der Polyneuritis die histologischen Veränderungen des Nervensystems, die in einem Schwinden der Nisslschen Granula ihren Ausdruck finden (vgl. ausführlich bei Kihr).

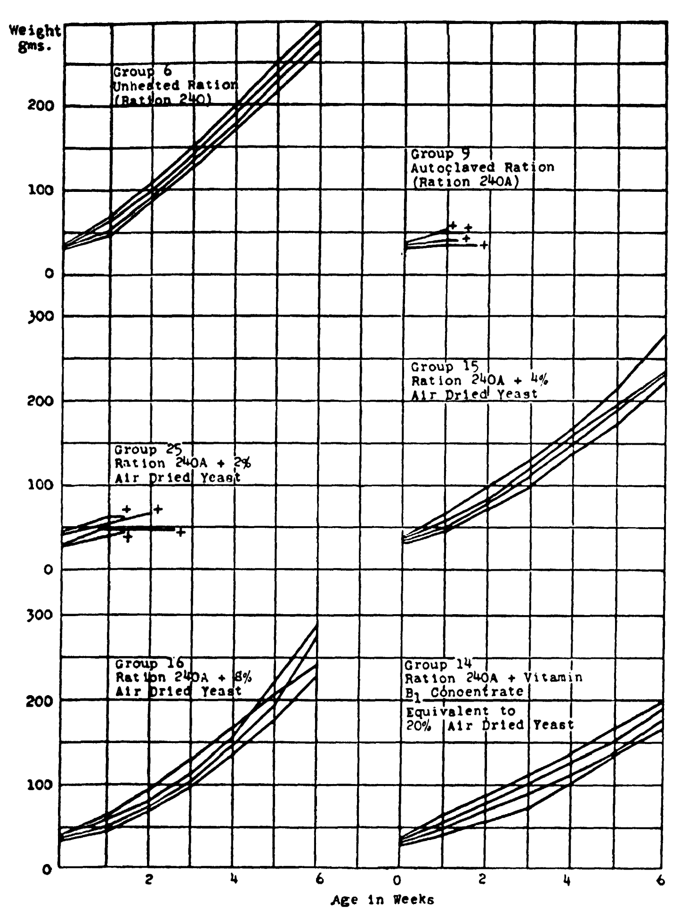


Abb. 69. Typische Gewichtskurven von Kücken auf der nichtautoklavierten (240) und auf der autoklavierten Kost mit B_1-Zugaben. (Nach Kline.)

Weitere Erscheinungen der experimentellen Beriberi 4a), 4b)

Hämorrhagien, wie sie für den Vitamin C-Mangel typisch sind, treten auch in manchen Fällen der experimentellen Avitaminose B_1 auf.

Resistenz: Die Resistenz gegen Infektionen aller Art ist erheblich vermindert. Die bakterizide Kraft des Bluts, die Agglutininbildung, ist herabgesetzt. Vielleicht

4a) Kline c. s., J. of biol. Chem. 99, 295 (1932).
4b) Norris c. s., Science 78, 643 (1930).

ist die Resistenzverminderung eine Folge des Temperatursturzes. Ebenfalls vermindert ist die Giftresistenz. Erhöht ist dagegen die Resistenz gegen Trypanosomen.

Pylorusspasmus: Moore 4) konnte bei Ratten Pylorusspasmus erzeugen und durch Injektion eines B_1-Konzentrats heilen.

3. Die experimentelle Beriberi bei Kücken und Huhn (l. c. 4a, 4b)

Im Gegensatz zur Taube benötigt das Kücken das Vitamin B_2. Werden junge Kücken im Alter von 1 Tag auf eine B-arme Kost gesetzt, so zeigen sie keine Gewichtszunahme und entwickeln Polyneuritis im Alter von 7—10 Tagen. Die Erscheinungen sind dieselben wie bei der Taube: Muskelinkoordination — Gleichgewichtsstörung — Opisthotonus der Nackenmuskulatur. Abb. 70 zeigt ein typisches Bild. Gewichtskurven mit und ohne B_1-Zulage sind aus Abb. 69 ersichtlich.

Bei Ernährung der Hühner mit Reis oder Weißbrot, Maisstärke, Makkaroni usw., erkranken sie nach einer gewissen Zeit an Beriberi. Die ersten Zeichen erscheinen nach 20—30 Tagen. Sie bestehen in einer beginnenden Paralyse der Extensoren der Beine. Der Vogel sitzt oder bewegt sich auf flexierten Tarsometatarsal-Gelenken. Die Paralyse geht dann rasch auf Flügel und die gesamte Muskulatur über. Das Tier liegt bewegungslos auf der Seite. Eine schwere Prostration führt in 1 Woche zum Tode. Ein Frühzeichen der Beriberi ist Cyanose des Kamms. Im Anfang sind spastische Erscheinungen selten. Ein weiteres Frühsymptom ist Dysphagie. Eingeführtes Wasser läuft wieder aus dem Schnabel heraus. Beim Füttern verschlucken sich die Tiere öfter. In akuten Fällen mit Gewichtssturz entwickeln sich die Erscheinungen in 24 Stunden. Nach weiteren 24 Stunden tritt unter Dyspnoe und Zyanose der Tod ein.



Abb. 70. Polyneuritis des Kückens. (Nach Kline.)

Die Gewichtsabnahme beträgt etwa 20%. Bei mehr chronischem Verlauf bleiben die Tiere ohne wesentliche Gewichtsabnahme etwa 4 Wochen am Leben. Die Erscheinungen sind dann Zyanose des Kamms und Lähmung der Beine. Die Entstehung der Hühnerberiberi wird durch Zwangsfütterung beschleunigt.

Außer an Hühnern läßt sich Beriberi auch an Enten, Gänsen, Sperlingen, Reisvögeln, Papageien und Wachteln erzeugen. Reine Beriberi ohne Gewichtsabnahme soll sich beim Huhn durch Verfütterung von Eigelb und gekochtem Fleisch hervorrufen lassen.

4. Die experimentelle Avitaminose B_1 bei der Ratte 5), 6), 7)

Bei der Ratte äußert sich die B_1-Avitaminose außer in nervösen Symptomen in Appetitnachlaß, Temperaturabfall, Atmungsverlangsamung, Tachykardie, Stillstand der Peristaltik, Versiegen der Salzsäuresekretion im Magen, Entzündungen der Darmschleimhaut und Gewichtsverlust.

Die Ratte ist erst für den Test auf das Vitamin B_1 brauchbar geworden, seit man erkannt hat, daß die Kostmischungen bei Ratten, die zur Erzeugung der Avitaminose B_1 dienen sollen, die anderen Vitamine, namtlich das Vitamin B_2 enthalten müssen. Fehlt das Vitamin B_2, so gehen die Tiere vor Entwicklung der Beriberisymptome ein.

---

4) Moore, Amer. J. of Physiol. 102, 605 1932.
5) Scheunert c. s., Krkh.forschg 4, 389 (1927).
6) Kihn, Zbl. Pathol. 33, 21 (1932).
7) Hofmeister, Biochem. Z. 128 (1922); 129, 467 (1922).

Gewichtsverlust. Junge Ratten wachsen auf einer vollwertigen Kost, in der nur das Vitamin B_1 fehlt, in der ersten Zeit normal, stellen dann aber die Gewichtszunahme ein. Zugabe von Vitamin B_1 führt zu erneutem Gewichtsanstieg.

Polyneuritis. Auch bei der Ratte kann man ausgesprochene polyneuritische Erscheinungen beobachten. Scheunert und Mitarbeiter konnten Spasmen und Paresen der Extremitäten, ausgesprochenen Opisthotonus mit Vornüberfallen, Roll- und Wälzbewegungen feststellen. Die Extremitätenkrämpfe erfolgten einseitig, beiderseitig oder gekreuzt. Kihn sah Kreisel-Reitbahnbewegungen, Rückwärtslaufen usw. Die Anfälle konnten durch Erschrecken der Tiere hervorgerufen werden.

Hofmeister beschreibt 4 Stadien der Rattenberiberi: 1. eine langdauernde Entwicklungsperiode oder Prodromalstadium, 2. ein ataktisches Stadium, 3. ein spastisches Stadium und 4. ein paralytisches Stadium.

„Das Prodromalstadium ist durch Appetitverlust, Gewichtsabnahme, zunehmende körperliche Schwäche und geistige Depression gekennzeichnet. Der Appetitverlust und die Gewichtsabnahme traten bei jungen Tieren oft erst nach einigen Tagen in Erscheinung. Öfters ist sogar, wie bereits erwähnt, in der ersten Woche der Beriberi-Kost noch eine geringe Zunahme des Gewichts zu beobachten. Häufig finden sich in den ersten Tagen größere Schwankungen, die wohl auf Unregelmäßigkeiten in der Aufnahme der ungewohnten Kost zu beziehen sind. Dann folgt ein sehr regelmäßiger 3—4 Wochen dauernder Gewichtsverlust, der sich in einer steil abfallenden, meist etwas nach unten konkaven Kurve ausdrückt."

„Der Abfall ist bei jüngeren Tieren weniger steil als bei ausgewachsenen. Ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen besteht nicht."

„Die Dauer dieses Gewichtssturzes bzw. des Prodromalstadiums überhaupt, bis zum Eintritt der ersten, sich als Ataxie charakterisierenden Störungen, zeigt große Gleichförmigkeit. Sie beträgt im Mittel 29 Tage."

Die Gewichtsabnahme kann 50% und mehr betragen. Durch stärkere Insulte können mit einem Schlag bei diesen Tieren die Symptome des nächsten Stadiums ausgelöst werden.

„Die Symptome des ataktischen Stadiums schließen sich sonst meist unmerklich dem Prodromalstadium an. Am meisten fallen die Gangstörungen ins Auge. Die normale, lebhafte Beweglichkeit fehlt. Die Tiere vermögen sich nur schwerfällig und schwankend fortzubewegen, oft ist das Gehen nur ein Schleichen und Kriechen. Bei größeren Anstrengungen erfolgen die Bewegungen zitternd, manchmal geradezu zappelnd. Auf die Seite oder auf den Rücken gelegt, vermögen sie sich anfangs mit der gewöhnlichen Flinkheit aufzurichten, fallen aber bei stärkerer Anstrengung öfter auf die Gegenseite. Auf glattem, namentlich geneigtem Boden, gleiten sie aus. Auf eine schmale Brettkante gestellt, vermögen sie nur sehr ungeschickt das Gleichgewicht zu bewahren und fallen leicht herunter. Sie getrauen sich nicht, aus geringer Höhe, z. B. 20—30 cm, herabzuspringen und, falls sie es riskieren, fallen sie ungeschickt auf oder überschlagen sich. . . . Beim Versuch, sich an einer Wand an den Hinterbeinen aufzurichten, verlieren sie leicht das Gleichgewicht."

„Mehr noch als im Prodromalstadium fällt die Unentschlossenheit und Willenlosigkeit der Tiere auf. Sie scheinen jede Initiative verloren zu haben. Auf die Tischplatte gesetzt, bleiben sie oft wie verdutzt sitzen, zeigen keine Neigung zu Fluchtbewegungen, ja sie suchen geradezu die Hand des Beobachters auf und kehren mit Vorliebe in den Käfig zurück, wo sie sich in einem dunklen Winkel zusammenkauern."

„Dieses Stadium, das nach dem Gesagten durch Schwäche und mangelhaftes Zusammenwirken des Muskelapparates, vor allem durch mangelnde Beherrschung des Gleichgewichts charakterisiert ist, kann bei raschem Verlauf der Krankheit direkt in das noch zu beschreibende paralytische Endstadium übergehen. Die Trägheit und Unbehilflichkeit der Bewegungen wird dann zur ausgesprochenen Parese, die Tiere bleiben erst vorübergehend, dann dauernd auf der Seite liegen, können

keinen Bissen mehr zum Maul führen, hören auf sich zu putzen und zu kratzen, bekommen ein struppiges Fell und verfallen bald in einen somnolenten Zustand. . . .“

„Dieser direkte Übergang des ataktischen in das paralytische Stadium ist etwa in der Hälfte der Fälle zu beobachten. In der anderen Hälfte schiebt sich zwischen sie die Periode der spastischen und Zwangsbewegungen ein.“

„Am häufigsten ist sie gekennzeichnet durch das Auftreten von tonischer Streckung der Extremitäten. Unter Fortbestand der Ataxie nehmen die spontanen, wie die durch äußere Reize veranlaßten Bewegungen krampfhaften Charakter an. Besonders betroffen sind die hinteren Extremitäten. Eine davon oder beide werden kürzer oder länger, steif abduziert gehalten oder beide sind nach rückwärts gestreckt.



Abb. 71. Erscheinungen der Rattenberiberi. (Nach Scheunert.)

Abb. 72. Rattenberiberi. (Nach Scheunert.)

Ist bloß eine Extremität betroffen, so zeigen die Tiere Reitbahn- oder Zeigerbewegung. . . . Werden die Tiere auf die Seite gelegt und versuchen sich aufzurichten, so kommt es infolge zu kräftiger Impulse nicht bloß zum Umfallen nach der anderen Seite, sondern auch zu schraubenförmigen, überraschend kräftigen Rollbewegungen um die Längsachse. Die Zwangsbewegungen erfolgen meist in derselben Richtung, doch kann diese auch am selben Tage wechseln. In schweren Fällen entwickelt sich eine tonische Streckung aller Extremitäten einschließlich der Pfoten, so daß die ruhig sich verhaltenden Tiere scheinbar in die Höhe gehoben werden und falls sie nicht eine Stütze finden, umfallen. Dabei ist der Kopf meist zurückgebeugt, der Rücken gekrümmt. . . .“

„Seltener zeigen sich klonische motorische Störungen, Zittern, Zappeln oder veitstanzähnliche Bewegungen, letztere namentlich in Form eines dauernden Pendelns des Kopfes, welches so heftig sein kann, daß das Tier trotz Anklammern an den Futternapf, nicht imstande ist, einen Bissen zu fassen.“

Selbst in diesem Stadium können die Tiere durch rechtzeitige Zufuhr des Vitamins innerhalb 24 Stunden vollkommen geheilt werden! Erfolgt keine Behandlung, so tritt allerdings das paralytische, zum Tode führende Stadium ein. Die Tiere verfallen in einen komatösen Zustand, der in kurzer Zeit tödlich endet.

Scheunert und Lindner (l. c. 5) sahen Krampferscheinungen bei Ratten dann besonders häufig, wenn die Kost das Vitamin B_1 in Spuren enthielt, die aber nicht für Wachstumsbeeinflussung ausreichten.

Die Haupterscheinungen waren Streckkrämpfe der Extremitäten, Zurückbiegen des Kopfes und spastische Schwanzstellung (Abb. 71). Der Schwanz ist oft steil in die Höhe gerichtet, wobei die Schwanzspitze nach dem Kopf zu gebogen ist. Öfter hebt sich bei den Tieren der Hinterteil krampfartig zuckend in die Höhe, bis schließlich das Tier zur Seite umfällt. Weiter kommt eine durch die starke Kontraktur der Rückenmuskulatur bedingte Kyphose der Wirbelsäule zur Beobachtung. Ebenso konnten Kaukrämpfe und Ptyalismus festgestellt werden.

Erwähnt sei noch, daß die vielfach bei der Rattenberiberi beobachteten Ödeme (Pfoten usw.) nicht auf B_1- sondern auf B_4-Mangel beruhen (s. dort).

Anatomische Veränderungen der Beriberi bei Ratten beschreibt Hofmeister, während Kihn die Nervenveränderungen studierte.

Danach besteht das Wesen der Avitaminose beim Tier in einer Degeneration der funktionierenden Elemente des Nervensystems, Ganglienzellen, deren Fortsätze und der Achsenzylinder. Die Veränderungen vollziehen sich in den verschiedenen Nervenpartien ungleich rasch. Bei Mensch und Huhn scheinen die peripheren Nerven zuerst und stärker zu leiden, bei der Ratte und der Taube das Zentralnervensystem.

5. Experimentelle Beriberi bei anderen Tieren

Typische Beriberi kann ebenfalls bei Mäusen, Affen, Hunden, Katzen und Meerschweinchen erzeugt werden. Spezifisch für den B_1-Mangel ist bei der Maus der Wachstumsstillstand, der nach etwa 14tägiger Fütterung eintritt.

II. Die Testmethoden auf Vitamin B_1

A. Versuchstiere und ihre Haltung

1. Tauben 8)

a) Auswahl und Haltung der Tiere vor dem Versuch

Kinnersley-Peters und Reader halten die beim Händler gekauften Tiere 20—30 Tage auf einer konstanten Kost, bevor sie in den Versuch kommen. Sie werden in großen Drahtkäfigen gehalten, die etwa 6 × 6 × 8 Fuß messen. Die Kost besteht aus:

Buchweizen	1 Teil
Weizen	2 Teile
Maisgrieß	1 Teil
Weizengrieß	1 ,,
Dari (Hanfsamen) . .	1 ,,

Versuchsreif sind Tauben mit einem Gewicht von 280—380 g. Man bevorzugt rein weiße Tiere.

8) Kinnersley-Peters-Reader, Biochemic. J. 22, 276 (1928); 18, 858 (1924).

b) Haltung der Tiere während des Versuchs

Nach der Vorbereitungsperiode setzt man die Tiere zu 15 zusammen in einen großen Drahtkäfig mit Drahtboden (zur Ausschaltung der Koprophagie), der 3mal wöchentlich gut gereinigt wird. Die Käfige enthalten stets frisches Wasser und Salzklumpen. Dazu erhalten die Tauben eine der nachstehenden B_1-freien Kostformen. Die Käfige stehen in einem Raum mit konstanter Temperatur (10—15°).

Nach Einsetzen der Beriberisymptome kommen die Tauben in Einzelkäfige und werden nun ins warme Labor gestellt. Sie sind nach Einhaltung gewisser Vorsichtsmaßregeln für den Therapietest fertig.

c) Fütterung der Tiere während des Versuchs

Die B_1-arme Kost wird ad libitum gegeben. Sie wird meist nach einiger Zeit verweigert. Die Tiere werden dann zwangsgefüttert. Die Fütterung geschieht mit kleinen Trichtern mit Gummistab in Mengen von 2mal täglich je 10 g. Zu beachten ist, daß Reis nur für eine gewisse Zeit eine vollwertige Nahrung darstellt. Für andere Testmethoden ist evtl. ein Zusatz zu füttern (s. dort).

2. Kücken

Kücken werden im Alter von 1 Tag in den Versuch genommen. Am besten eignen sich weiße Leghornkücken mit einem Gewicht von 30—35 g. Die Tiere werden in Einzelkäfigen, die heizbar sind, gehalten. Sie erhalten die B_1-arme Diät und Wasser ad libitum. Um ein Zerstreuen des Futters durch Kratzen usw. zu vermeiden, wird der Futternapf mit einem Deckel, der nur ein kleines Loch enthält, versehen. Die Tiere werden täglich gewogen. Am Ende jeder Woche wird der Nahrungskonsum registriert. Auf normaler Diät erreichen sie nach 6 Wochen ein Gewicht von 300 g.

Kücken eignen sich besonders zur Feststellung des Vitamins B_1-Gehalts eines Materials, das auch an Vitamin B_2 reich ist.

3. Ratten

a) Auswahl und Haltung der Tiere für den Wachstumstest

Ratten werden im Alter von 21—28 Tagen in den Versuch genommen. Sie werden in den gewöhnlichen Käfigen aus Drahtgeflecht gehalten. Man verwendet nur Tiere, die unter denselben Bedingungen aufgezogen wurden, und verteilt sie nach Gewicht, Geschlecht und Abstammung auf verschiedene Gruppen. Zur Auswertung von 5 Substanzen braucht man etwa 50 Tiere, die man aus 6—8 Würfen unschwer zusammenbekommt. Man verteilt sie in 5 möglichst gleichmäßige Serien. Die Tiere werden wöchentlich mindestens 2mal gewogen.

b) Erscheinung der Refektion

Enthält die Diät bei Ratten reichlich Reisstärke, so kann nach anfangs typischem Verlauf der Avitaminose plötzlich Selbstheilung eintreten unter Ausscheidung großer Mengen weißer voluminöser Fäzes, die von den Tieren gern gefressen werden. Man nennt nach Fredericia 9) diese Erscheinung „refection". Sie ist übertragbar durch ein in den Fäzes vorhandenes Virus, das durch Kochen zerstört wird. Die auftretenden Mikroorganismen synthetisieren das Vitamin B_1. Man erkennt das Vorliegen der Refektion außer an den

9) Fredericia, J. of Hygiene 27, 70, 1927.

beschriebenen Merkmalen am besten aus dem plötzlichen Anstieg der Gewichtskurve. Um der Refektion vorzubeugen, ist es unbedingt nötig, sämtliche Kostformen für die Ratte längere Zeit zu erhitzen. Auch ohne Refektion enthalten Fäzes stets Vitamin B_1. Es muß stets darauf geachtet werden, daß den Tieren keine Gelegenheit zur Koprophagie gegeben wird. (Keine Holzwolle, keine Streu in den Versuchskäfigen!)

c) Fütterung der Tiere

Die Fütterung geschieht unter den für Testversuchen üblichen Kautelen. Eine neue Technik gibt Mitchell 10) an, der die paarweise Fütterung einführt. Dabei wird stets ein Rattenpaar im selben Käfig gehalten, sie bekommen dieselbe Kost und dieselbe Menge der zu prüfenden Substanz. Außerdem wird aber dem einen Tiere eine bestimmte Menge eines Vitamin B_1-Standards verabreicht. Es wird nun diejenige Menge gesucht, die bei beiden Tieren dieselbe Gewichtszunahme herbeiführt, d. h. es wird auf optimale Vitaminversorgung getestet.

d) Auswahl der Tiere für den kurativen Beriberitest

Für den kurativen Test, d. h. für den Test, der die Heilung der Rattenberiberi als Kriterium benutzt, nimmt man besser ausgewachsene Ratten, die bei Versuchsanfang etwa 250 g schwer sind (weibliche Tiere etwa 170 g). Sie erhalten eine der angegebenen Kostformen und müssen in den folgenden 21—24 Tagen erheblich an Gewicht abnehmen.

4. Mäuse

Mäuse werden im Alter von 3 Wochen in den Versuch genommen. Die Gewichtszunahme hört im Alter von 28—38 Tagen gewöhnlich auf. Sie sind dann für den Wachstumstest verwendbar. Tägliche Gewichtskontrollen sind angebracht.

B. Vitamin B_1-freie Kostformen

1. Für Tauben

a) Diät nach Peters und Mitarbeiter

Polierter Reis ad libitum
Salz (NaCl)
Lebertran.

Der Reis wird nach mehrstündigem Wässern unter der Wasserleitung getrocknet und darauf 8 Stunden lang auf 120° erhitzt. Salz ist in Klumpen in den Käfigen enthalten. Tran wird einzeln verabreicht.

b) Diät nach Randoin und Mitarbeiter

Weizeneiweiß	20 g	
Zucker	230 g	
Butter	20 g	
Filterpapier	10 g	
Agar-Agar	40 g	
Salzgemisch Osborne	20 g	
Citronensaft	30 ccm	(fraglich ob nötig)

Die Kost wird vor der Fütterung erhitzt.

---

10) Mitchell, Amer. J. Physiol. 104, 594 (1933).

c) Diät nach Marrian

Reisstärke	66 %
Casein	16 %
Agar-Agar	8 %
Butter	4 %
Papier	2 %
Salzgemisch 185	4 %

d) Diät nach Block-Cowgill usw. für den Taubenwachstumstest

Reis poliert	ad libitum
Handelsfleischrückstände der Fleischsaftfabriken	
Salzgemisch Osborne	0,075—0,1 g pro die
Lebertran	2 Tropfen pro die

Lebertran und Salze werden täglich in kleinen Gelatinekapseln verabreicht.

2. Für Kücken

a) Diät nach Hunt und Kraus

Reis, poliert	78 %
Casein	16 %
Salzgemisch	4 %
Lebertran	2 %

Bei B_1-Zugabe erhalten Kücken ihr Gewicht und sind gesund. Bei Zugabe von B_2 (wichtig!!) tritt Gewichtsverlust und Polyneuritis ein.

b) Diät von Kline-Elvehjem-Keenan-Hart

Mais	58 %
Weizen, mittelfeines Mehl	25 %
Casein	12 %
Salzgemisch	1 %
Lebertran	2 %
Calciumcarbonat	2 %

Vorstehende Kostform ist für das Kücken voll ausreichend. Erhitzt man sie aber (ohne Tran und Calciumcarbonat) 5 Stunden bei 120° im Autoklaven, so wird sie durch Zerstörung des Vitamins B_1 in eine Beriberi erzeugende verwandelt. Kücken zeigen schon nach 7—10 Tagen, wenn sie damit gefüttert werden, Krämpfe. Sie bleiben im Wachstum zurück. Zugabe von 2 % Trockenhefe verhütet die Entstehung der Beriberi nicht. Erst 4 % führen zu normalem Wachstum. Zugabe von autoklavierter Hefe oder B_2 sind ohne Einfluß. Die Diät eignet sich besonders zur Auswertung sehr B_2-reicher Nahrungsmittel auf B_1 11).

3. Vitamin B_1-arme Diäten für Ratten

Allgemeines

Bei der Herstellung einer B_1-armen Kost für die Ratte muß berücksichtigt werden, daß sie auf eine genügende Zufuhr des Vitamins B_2 angewiesen ist. Man kann das Vitamin B_2 entweder in Form autoklavierter Hefe oder aber in Form von „Ei"weiß einer Kost einverleiben.

Zulage von Hefe hat den Nachteil, Diarrhöen hervorzurufen, die das Tier bedeutend schwächen und die Auswertung stören können. Allerdings wird in den allermeisten Kostformen ein Hefezusatz verwandt. Das Eiereiweiß scheint der Hefe nicht gleichwertig zu sein. Zugabe einer bestimmten B_1-Menge ruft auf einer Kost, die B_2 als autoklavierte Hefe enthält, besseres Wachstum hervor als auf einer Kost, die Ei (in Form von Eiweiß) enthält. Es fehlt im

11) Kline-Elvehjem usw., J. of biol. Chem. 99, 295 (1932/33).

Weißen des Hühnereies ein weiterer Faktor, der für das Wachstum der Ratte erforderlich ist, der in der Hefe vorhanden ist (s. hinten).

Bei der Herstellung einer B_1-armen Kostmischung ist auf B_1-Freiheit aller verwandten Bestandteile zu sehen. Alle Kostmischungen für den B_1-Test bei der Ratte werden zweckmäßig 3—5 Stunden auf 100⁰ erhitzt, um der Refektion vorzubeugen. Weiter ist für genügende Zufuhr der Vitamine A und D Sorge zu tragen.

Reinigung des Caseins

Das Casein wird aus abgerahmter Milch (Zentrifuge) durch sehr verdünnte Salzsäure gefällt, durch Gaze abfiltriert und nach Abpressen in sehr verdünnter Natronlauge gelöst. Die Umfällung wird 3mal wiederholt. Die alkalische Lösung wird schließlich durch Gaze filtriert und nochmals gefällt. Man wäscht das Casein mit 50 %igem Alkohol, dann mit 96 %igem und trocknet an der Luft.

3 kg dieses Caseins oder des käuflichen Produkts werden in 30 Liter Wasser suspendiert, mit 50 ccm Eisessig und je 5 ccm Chloroform und Toluol versetzt und 14 Tage unter öfterem Rühren gewässert. Dabei wird die Lösung oft erneuert. Während der 3 letzten Tage nimmt man statt Leitungswasser destilliertes Wasser. Das Casein wird abfiltriert und getrocknet. 5 kg des trocknen Pulvers (100^0) werden mit 25 Liter 25 %igem Alkohol 24 Stunden lang unter Rühren bei Zimmertemperatur behandelt. Man wäscht mit 96 %igem Alkohol und trocknet bei 100^0.

Nach einer anderen Vorschrift werden 200 g Casein in 1 Liter 60 %igem Alkohol suspendiert und 30 Minuten gerührt. Die Mischung bleibt 5—6 Stunden stehen. Das Casein wird abgesaugt und mit 500 ccm Alkohol gewaschen. Der Prozeß wird wiederholt, wobei das Gemisch mindestens 18 Stunden stehen bleiben muß. Das Casein wird schließlich mit 96 %igem Alkohol gewaschen und getrocknet.

Reinigung der anderen Kostbestandteile

Fleischrückstände werden durch eine Hackmaschine sehr fein zerkleinert und in kleinen Portionen in kochendes Wasser eingetragen. Die Lösung muß einige Minuten sieden. Man preßt den Niederschlag ab und trägt ihn nochmals in kochendes Wasser ein. Das Fleisch wird anschließend bei 60^0 getrocknet.

Stärke kann durch Alkoholextraktion von den anhaftenden B_1-Spuren befreit werden.

Die einzelnen Kostformen

Nr. 1. Sherman-Spohn 12), 13).

Eine der besten und gebräuchlichsten Kostformen für den Vitamin B_1-Test ist die Kost von Sherman-Spohn, die aus folgenden Bestandteilen besteht:

Casein	18 %
Stärke	68 %
Butterfett	8 %
Salze	4 %
Lebertran	2 %

12) Sherman-Spohn, J. amer. chem. Soc. 45, 2719 (1923).
13) Sherman-Kramer, J. amer. chem. Soc. 46, 1055 (1924).

Außerdem erhalten die Tiere autoklavierte Hefe oder autoklavierten Hefeextrakt zur Deckung des Vitamin B_2-Bedarfs. Zugabe von 0,5 g Trockenhefe pro die genügt, um die Kost vollwertig zu machen.

Nr. 2. Chick und Roscoe 14).

Die Kost ist die für den Rattenwachstumstest am meisten benutzte. Sie besteht aus:

Casein, extrahiert und erhitzt	100	Teile
Reisstärke	300	,,
Arachisöl	75	,,
Salzgemisch McCollum	25	,,
Wasser	500	,,

Die Tiere erhalten außerdem einen Vitamin B_2-Extrakt oder autoklavierte Hefe, weiter 0,05—0,1 g Lebertran pro die. Die Hefezulage entspricht 0,4 g autoklavierter Hefe.

Nr. 3. Kinnersley c. s. 15).

Eine Kost, die für den kurativen Rattentest geeignet ist, beschrieben Kinnersley und Mitarbeiter. Sie besteht aus:

Casein, Brit. Droug. House	20 %
Reisstärke	70 %
Agar-Agar	2 %
Salzmischung McCollum	5 %
Lebertran	3 %
Hefe, autoklaviert	6 %

Statt Hefe kann ein autoklavierter Hefeextrakt Verwendung finden.

Bemerkungen zu nachstehender Tabelle. Zu Nr. 4 und Nr. 5: Die beiden Kostformen stellen die Typen dar, aus denen sich viele andere Diäten entwickelt haben. Die Bestandteile werden in der oben beschriebenen Weise vor der Verwendung gereinigt. Zu Nr. 6: Die Hofmeistersche Kost ist besonders für den kurativen Test am erwachsenen Tier geeignet. Sie wird durch Zusammenkneten der Einzelbestandteile mit Wasser hergestellt (etwa 70 ccm Wasser für 100 g Mischung). Casein und Reisstärke werden mit Alkohol extrahiert und erhitzt. Der Gehalt an Lebertran ist für heutige Begriffe zu hoch. Zu Nr. 7: Die Kost ist eine Modifikation der Nr. 1. Sie ist unter der Bezeichnung 94 bekannt. Zu Nr. 8: Weizenmehl und Fleischrückstände werden mit Alkohol extrahiert (12 Stunden, 96 %iger Alkohol). Zu Nr. 9: Die Kost ist eine Modifikation der Nr. 2. Nr. 2 ist als P 2 L-Kost bekannt. Nr. 9 wird auch mit FL bezeichnet. Nr. 9 enthält light white Casein und hat den Vorteil, besseres Wachstum zu gewährleisten. Zu Nr. 10: Die Kost wird in der Literatur als EL bezeichnet. Man vervollständigt sie durch Zugabe von 2—5 Tropfen Lebertran pro die. Zu Nr. 11 und 12, 13: Die Kostformen enthalten statt Stärke reinen Rohrzucker, der vollkommen vitaminfrei ist. Zu Nr. 14 und 15: Das Fleisch wird 6 Stunden bei 100° autoklaviert. Zu Nr. 16: Die Kost muß durch Zugabe autoklavierter Hefe vervollständigt werden. Crisco ist hydriertes Baumwollsamenöl mit dem Schmelzpunkt = 38. Die Kost enthält außer den angegebenen Bestandteilen noch weitere 2 % Agar-Agar. Zu Nr. 17: Die Kost wird durch 2 % Agar-Agar vervollständigt. Zu Nr. 18: Lebertran und Butterfett werden kühl aufbewahrt und erst kurz vor der Fütterung zugegeben. Alle anderen Bestandteile werden mit Wasser zu einem Brei angerührt und autoklaviert. Das Casein wird wie oben gereinigt. Die Kost enthält außerdem 2 % Agar-Agar. Zu Nr. 19: Die Marmitelösung wird 2 Stunden bei alkalischer Reaktion autoklaviert.

14) Chick-Roscoe, Biochemic. J. 23, 498 (1929); 24, 1744 (1930).
15) Kinnersley-Peters-Reader, Biochemic. J. 24, 1820 (1930).

Weitere B_1-freie Kostmischungen für den Rattenversuch

Nr.	Autor	Stärke %	Dextrin %	Casein %	Fett %	Salz-mischg. %	Tran %	Hefe, autokl. %
4	Osborne.	52,4	—	19,6	9 B 15 S	4		
5	Osborne.	50,5	—	18	9 B 18 S	4,5		
6	Hofmeister	50	—	22	13 C	5	10	
7	**Sherman**	**68**	—	**18**	**10 B**	**4**		
8	Sherman	82		10 F		4		4
9	Chick . .	dieselbe Kost wie Nr. 2 mit light white Casein						
10	Chick . .	25	—	66 H	6,3 Ba	2,1		
11	Evans . .	70 Z	—	20	—	4	2 Tr. T/T	10
12	Evans 16)	59 Z	—	20	10 S	4		10
13	Burr 16) .	72,2 Z	—	24	—	3,8		
14	Sure 17) .	—	61	15 F 10	10 B	4		
15	Sure 17) .	—	64	20 15 F	10 B	4		
16	Hunt 18) .	64	—	18	10 Ba	4	2	
17	Walker 19)	—	67	18		4	2	3
18	Guerrant 20)	—	56 15 Z	18	3 B	4	2	
19	Guha 21) .	75	—	21		4	1 Tr. T/T	1 ccm 50 % Marm. Lg.
20	Drury 22)	55		20	20 A	5	2 Tr. T/T	

Zeichenerklärung: B = Butterfett, C = Cocosfett, S = Schweinefett, Ba = Baumwollsamenöl, gehärtet, Crisco, Z = Zucker, Tr. T/T = Tropfen pro Tag/Tier, F = Fleischrückstände, H = Weißes vom Hühnerei.

B_1-arme Kostmischungen für Mäuse

Eine Kost, die für den Test an der Maus Verwendung findet, ist folgende:

Casein, gereinigt	31 %
Kornstärke	38 %
Crisco	24 %
Salzgemisch Osborne	7 %

Dazu täglich 200 mg autoklavierte Hefe pro Tier und 2 Tropfen Lebertran.

16) Evans-Lepkovsky, J. of biol. Chem. 83, 269 (1929). — Evans-Burr, J. of biol. Chem. 77, 232 (1928). — Lepkovsky-Wood-Evans, J. of biol. Chem. 87, 239 (1930).

17) Sure, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 779 (1933); J. of biol. Chem. 76, 673 (1928); 83, 387.

18) Hunt, J. of biol. Chem. 79, 725 (1928).

19) Walker-Nelson, Amer. J. Physiol. 103, 25 (1933).

20) Guerrant-Dutcher, J. of biol. Chem. 98, 225 (1932).

21) Guha-Drummond, Biochemic. J. 23, 880 (1922).

22) Drury-Harris, Biochemic. J. 24, 1632 (1930).

C. Die einzelnen Testmethoden

1. Der kurative Taubentest von Kinnersley und Peters 23), 24), 25)

Tauben, die bei einem Anfangsversuchsgewicht von 280—380 g nach ausschließlicher Ernährung mit poliertem, gewässertem, autoklaviertem Reis unter Zusatz von Lebertran und Kochsalz oder mit einer der anderen Diäten gefüttert wurden, entwickeln typische Polyneuritis zu 40—50 % innerhalb 3 bis 5 Wochen. (Die Gewichtsabnahme der Taube beträgt etwa 50—60 % des Ausgangsgewichts bis zum Eintreten der typischen Beriberisymptome.) Das Auslösen der Krämpfe wird durch niedrige Temperatur und durch Witterungsumschläge begünstigt. Bringt man solche Tiere ins warme Labor, tritt spontan Wärmeheilung ein, während der sich der Krampf für mehrere Stunden bis zu 1 Tag löst. Diese Heilung ist stets von einem neuen Anfall gefolgt. Erst in diesem Stadium sind die Tiere versuchsreif.

Für Testversuche gelangen nur solche Tiere zur Anwendung 26 a), 26 b), 27), die erstens die rein spastische Form der Beriberi zeigen und die zweitens mehrere Stunden bei der Temperatur des Versuchsraumes ununterbrochen im Beriberikrampf verharren. Ausgewertet werden nur Versuche, bei denen die Heilung nach 3—6 Stunden eintritt und mindestens 36 Stunden einwandfrei anhält. Normalerweise dauert die Heilung mit der unteren Vitamingrenzdosis 2—4 mal 24 Stunden. Zur Erzielung eines guten Durchschnittswertes werden 6 Tauben für jedes Präparat benötigt, die die Substanz in Wasser gelöst subkutan unter den Flügel injiziert erhalten.

Sind die Tiere nach der Injektion anscheinend geheilt, lebhaft, zeigen aufrechte Haltung, putzen die Federn usw., so kann Pseudoheilung eingetreten sein. Um dies zu entscheiden, wird der Kopf der Taube einige Male in dieselbe Lage gebogen, die er beim Krampf innehatte. War die Dosis zu klein oder lag Pseudoheilung vor, so kann man auf diese Weise, wenigstens vorübergehend, den Krampf wieder auslösen. Zeigt diese Behandlung keinen Einfluß, so wird das Tier mehrere Male im Kreis herumgeschwenkt. Wird auch hierdurch kein Krampf ausgelöst, so ist die Heilung als fast sicher anzusehen. Immerhin reagieren einige Außenseiter auch hierauf nicht, doch werden diese dadurch, daß der Test an 6 Tieren zugleich ausgeführt wird, leicht erkannt.

Die Prüfung auf Pseudoheilung ist außerordentlich wichtig 26). Viele in der Literatur als kristallisierte Vitamin B-Präparate angesprochene Substanzen sind bei richtiger Auswertung vollkommen wirkungslos. Schon mancher Trugschluß hätte bei richtiger Technik vermieden werden können.

Die Berechnung der Wertigkeit des Präparats erfolgt, indem man das Gewicht der Dosis durch die Anzahl der Tage bis zum Wiederauftreten der Krämpfe dividiert und dadurch die Taubentagesdosis des Präparats erhält.

Eine Taubentagesdosis ist gleich einer internationalen Einheit (Kinnersley).

---

23) Kinnersley-Peters c. s., Biochemic. J. 18, 585 (1924); 19, 820 (1925); 21, 777 (1927); 22, 267, 419 (1928); 24, 1832, 1944 (1930).
24) Schultz-Laquer, Z. physiol. Chem. 219, 158 (1933).
25) Williams-Seidell, J. of biol. Chem. 26, 431 (1916).
26) Kon, Biochemic. J. 20, 834 (1927).
26a) Scheunert-Schieblich, Z. Tierzüchtg 8, 315 (1927).
26b) Coward c. s., Biochemic. J. 27, 1719 (1933).
27) Guha-Drummond, Biochemic. J. 23, 882 (1929).

Zu beachten ist, daß bei Injektion der Substanz eine etwa 30 % größere Wirkung erzielt wird, als nach peroraler Darreichung.

Tiere, die zu schwach sind, werden selbstverständlich nicht für die Auswertung herangezogen. Am besten nimmt man nach Kinnersley c. s. nur solche Tiere, die vor dem 30. Tage an Beriberi erkrankten. Der Ausbruch der Krämpfe ist für ein und dasselbe Tier sehr konstant („day constant“), doch für verschiedene Tiere differierend. Man kann Tiere auf der Reiskost einteilen in schnell reagierende, bei denen typische Symptome schon nach 17 Tagen erscheinen, mittel reagierende, bei denen in 17—23 Tagen die typischen Krämpfe erfolgen, und langsam reagierende, die erst in 23—30 Tagen ansprechen. Gewicht und Farbe der Tiere spielen dabei keine Rolle.

Die zu prüfende Dosis muß innerhalb 6—12 Stunden nach Einsetzen der Symptome verabreicht werden. Die Heilung soll nicht mehr als 10 Tage betragen. Nach dem Wiederauftreten der Symptome erhalten die Tiere eine genügende Dosis Marmite und bleiben noch 2—3 Tage im Labor. Dann kommen sie wieder zu den anderen Tieren in den Tierstall und erhalten die Standardkost. Nach 20—30 Tagen sind sie wieder für Reisernährung brauchbar.

Außer der Wärmeheilung, auf die wie oben geprüft wird, ist vielfach empfohlen, den Tieren vor dem Test eine Dosis von Glukose zu verabreichen. Einige Tiere zeigen darauf Heilung und werden ausgeschaltet.

Eine gewisse Rolle bei der Auswertung eines Präparates spielen weiter die abnorm stark reagierenden Tiere, die schon mit Dosen geheilt werden, auf die andere noch nicht reagieren. Durch genügend große Serien kann man solche Fälle ausschalten. Bei der Berechnung werden sie nicht berücksichtigt. Ein Beispiel eines solchen Falles ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

Tabelle 60

Preparation. Stock H. 0,1 cc. = 1/1900 of the whole

Dose	Bird	Day on which symptoms appeared	Days of cure and protection	
0,1 cc.	37	23 rd	2	
	52	24 th	2	
	[60	24 th	(6) ?]	abnormal
	2	31 st	2	
0,2 cc.	30	—	3	
	1	23 rd	4	
	56	30 th	4	
	98	18 th	7	
	66	28 th	7	

Die Fehlergrenze der Methode beträgt etwa 40 %.

Die Methode ist nicht ganz einfach zu handhaben. Man halte sich stets die Fehlermöglichkeiten vor Augen. Manche Fehler lassen sich vermeiden, wenn man wie oben beschrieben verfährt. Man muß also:

1. die Tiere vor Beginn des Versuchs mindestens 20—30 Tage auf einer vollwertigen Standardkost halten.
2. Die Hitzeheilung ausschalten.
3. Die Glucoseheilung prüfen und erst, wenn diese negativ ausfällt, testen. Die meisten Tiere lassen sich nur einmal durch Glucose zur Heilung bringen und sind dann brauchbar. Immerhin sind Fälle bekannt, in denen die Heilung durch Glucose stets eintrat. Solche Tiere sind unbrauchbar.

4. Die Wasserheilung ausschalten. Einige wenige Tiere sind durch Wasserinjektion heilbar. Diese Fehlerquelle ist schon durch die Prüfung auf Glucoseheilung ausgeschaltet.
5. Die zu stark reagierenden Tiere vernachlässigen und stets mit einer ganzen Serie von Tieren für jede Dosis arbeiten.

Die Prüfung auf Glukoseheilung geschieht durch Injektion von 20—40 mg Glucose. Noch eine weitere Fehlermöglichkeit ist gegeben. Es ist bekannt, daß einige Tiere überhaupt nicht auf Zufuhr von B_1 reagieren. Kinnersley c. s. fanden, daß etwa 1 % aller Tauben durch Zufuhr von B_1 nicht geheilt werden. Durch Anwendung genügend großen Tiermaterials läßt sich dieser Fehler vermeiden.

Tabelle 61 nach Windaus und Mitarbeiter (l. c. 56) zeigt ein typisches Auswertungsbeispiel mit der rein dargestellten Substanz:

Tabelle 61. Taubenversuche

Nr.	Anfangsgewicht in g	Auftreten der Krämpfe nach Tagen	Nach dieser Zeit Gewicht in g	Angew. Dosis in γ	Anzahl der Tage, während welcher die Krämpfe ausblieben	Tagesdosis in γ
12	478	23	297	6,6	4	1,7
20	373	18	276	6,6	2	3,3
35	400	25	266	6,6	2	3,3
79	373	18	228	6,6	3	2,2
110	363	21	223	6,6	3	2,2
44	380	21	249	6,6	3	2,2
53	405	27	249	6,6	2	3,3
78	406	20	313	6,6	3	2,2
108	451	25	268	6,6	4	1,7
93	355	29	212	5,5	2	2,7
183	407	25	245	5,5	2	2,7
30	449	23	270	5,5	2	2,7
13	411	27	240	5,5	3	1,8
15	442	20	302	5,5	2	2,7
40	380	26	220	5,5	4	1,4
32	420	25	228	5,5	2	2,7

2. Der prophylaktische Taubentest

Die oben beschriebene Methode der Auswertung des Vitamins B_1 kann auch in prophylaktischer Form Anwendung finden. Allerdings ist sie weniger sicher. Man hat bei der prophylaktischen Methode zwei Fehlerquellen zu berücksichtigen. Erstens muß der „day constant" des Tieres, d. h. der Tag an dem die Taube unbehandelt gelassen, an typischen Erscheinungen erkrankt, bekannt sein und zweitens muß man berücksichtigen, daß nach etwa 30 tägiger Reisfütterung der Vitamin B_1-Bedarf des Tieres ein größerer ist als vorher. Man kann also z. B. ein Tier während 30 tägiger Fütterung durch prophylaktische Gaben vor der Polyneuritis schützen, aber in manchen Fällen tritt nach dieser Zeit doch die Krankheit auf.

3. Der kurative Rattentest von Peters und Mitarbeiter 29)

Der Test beruht auf der Erscheinung, daß ausgewachsene Ratten (männlich, Gewicht etwa 250 g, weiblich, Gewicht etwa 170 g) auf einer B_1-freien Kost nach 21—24 Tagen 100—120 g an Gewicht verlieren und typische, auf B_1-Mangel

29) Kinnersley-Peters-Reader, Biochemic. J. 24, 1820 (1930).

beruhende Erscheinungen zeigen, die durch Zufuhr von Vitamin B_1 behoben werden können. Die Erscheinungen sind die von Hofmeister beschriebenen. Es setzen nach etwa 21—24 Tagen ziemlich unvermittelt Konvulsionen ein, die von Paralyse der hinteren Extremitäten begleitet sind. Nur Tiere im ataktischen oder spastischen Stadium sind zu verwerten.

Die zu prüfende Substanz wird am besten mit der Pipette oder aber subkutan gegeben. War sie wirksam, zeigt sich schon nach 20 Minuten eine deutliche Besserung im Zustand des Tieres. Die Heilung dauert je nach der Dosis längere oder kürzere Zeit. Im allgemeinen ist eine Heilung von 8—12 Tagen zu erzielen. Das Tier wird bis zum Auftreten neuer Beriberisymptome beobachtet und die Zeit als Maßstab der Wirkung angesehen. Die Berechnung erfolgt wie bei der Taubentagesdosis, indem man die Dosis durch die Anzahl Tage bis zum Wiederauftreten der Erscheinungen dividiert und so die Rattentagesdosis des Präparats erhält. Eine Rattentagesdosis entspricht etwa 0,5 bis 1 Taubentagesdosis. Die Rattentagesdosis ist identisch mit der Sherman-Einheit.

Bei der Auswertung ist zu beachten, daß nicht alle Symptome der Beriberi während der Behandlung verschwinden. So bleiben z. B. die Ataxie und die Ödeme der Füße bestehen. Sie beruhen nicht auf Mangel an B_1, sondern auf B_4-Mangel (s. dort). Als Kost wird am besten die Hofmeistersche oder die von Peters-Kinnersley und Reader verabreicht. Der kurative Rattentest ist nicht so genau wie der Taubentest. Doch kann man bei einiger Übung vergleichbare Werte erzielen:

Tabelle 62

	Dose of vitamin B_1 prep. cc.	No. of day doses		Activity mg.
		Pigeons	Rats	
(A)	1,0	4,4 (20)	4 (3)	1,2
(B)	0,1	2,9 (37)	4,5 (12)	0,13
	0,15	—	6 (2)	0,13
(C)	0,10	3,8 (8)	3,5 (5)	0,10
(D)	0,08	5,0 (3)	4 (6)	0,25

Tabelle 63

A. Pigeon tests

Bird	Month of test	Weight g.	Days on diet	Dose mg.	Day cure	Day dose mg.
a) Doses introduced by the mouth:						
213	July	220	20	0,044	9	0,005
104	,,	217	19	,,	5	0,008
166	,,	240	17	,,	3	0,015
123	June	217	26	,,	5	0,009
174	July	250	25	,,	4	0,011
210	June	300	—	,,	11	0,004
153	,,	208	13	0,029	9	0,003
130	,,	224	20	0,087	8	0,011
149	,,	280	20	0,029	2	0,015
					Average	0,009 mg.

Bird	Month of test	Weight g.	Days on diet	Dose mg.	Doy cure	Day dose mg.
b) Doses injected into breast muscle in 0,5 cc. 0,9 % saline:						
103	Aug.	170	15	0,020	2	0,010
345	„	250	30	0,018	7	0,0025
390	Sept.	294	24	0,024	4	0,006
254	Oct.	202	27	„	2	0,012
411	„	258	27	„	6	0,004
365	„	260	27	„	4	0,006
					Average	0,007 mg.

B. Rat tests

Rat	Dose mg.	Day cure	Day dose mg.
346	0,029	8	0,004
376	0,029	7	0,004
347	0,020	3	0,007
386	0,020	3,5	0,006
		Average	0,005 mg.

4. Der Test am Reisvogel

Holländer und Japaner bevorzugen zum Nachweis des Vitamins B_1 den Versuch am Reisvogel (Munia maja). Spruyt gibt folgende Technik **30)**:

Die Reisvögel werden in Zehnergruppen in großen Käfigen gehalten und 14 Tage lang ausschließlich mit poliertem gewässertem Reis und Wasser gefüttert. Dann erhalten sie das zu prüfende Präparat. Dabei wird die Substanz in wäßrig-alkoholischer Lösung auf dem polierten Reis getrocknet und verfüttert. Die Tiere erhalten den so behandelten Reis ad libitum. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Ergebnisse mit denen eines Standardversuches, in welchem ein kristallisiertes Vitamin B_1-Präparat auf Reis getrocknet verfüttert wurde.

Trocknet man ein Vitamin B_1-Präparat, das in 0,4 mg etwa 100 internationale Einheiten besitzt auf 500 g Reis und füttert damit die 14 Tage mit Reis vorbehandelten Tiere, so zeigen von der Zehnergruppe nach 15 Tagen 2 Tiere Polyneuritis, nach 21 Tagen sind 2—3 Tiere erkrankt. Wurden auf 500 g Reis über 100 E. getrocknet, so erkranken in den ersten 12 Tagen von 10 Tieren höchstens 1. Enthielt der Reis 75 internationale Einheiten Vitamin B_1, so sind nach 15 Tagen 3—4 Tiere polyneuritisch und nach 21 Tagen alle erkrankt. Wurden weniger als 75 E. auf 500 g Reis gegeben, so zeigen nach 15 Tagen alle Vögel Polyneuritis. An Hand dieser Skala kann der Vitamin B_1-Gehalt jeder auf dem verfütterten Reis getrockneten Substanz direkt in internationalen Einheiten bestimmt werden.

Beispiel: Auswertung des B_1-Gehalts von unpoliertem Reis. 500 g des unpolierten gemahlenen Reises werden mit 3 Liter Extraktionsflüssigkeit 20 Stunden lang extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit enthält auf 1 Liter Wasser 200 ccm Alkohol, 96 %ig, 2,5 ccm 25 %ige Salzsäure und 10 ccm Toluol. Der p_H beträgt vor der Extraktion 1—2, nach beendigter Extraktion 3—4. Man trocknet von diesem Extrakt, der aus 500 g Reis gewonnen wurde $^2/_3$, $^1/_2$, $^1/_3$ oder $^1/_4$ auf 500 g poliertem gewässertem Reis und verfüttert jede dieser Reissorten an je 10 Tiere, die vorher

30) Spruyt, Arch. néerl. Physiol. 1934, 295.

14 Tage lang nur polierten Reis erhielten. Die Wirksamkeit wird nach den Tieren berechnet, die nach 3 Wochen gesund bleiben. Im Parallelversuch wird ein auf Reis getrocknetes Standardpräparat bekannter Wirksamkeit verfüttert.

Tabelle 64

Einheiten pro 500 g Reis im Reisvogeltest	mg Vitamin in 500 g Reis
225	0,9
450	1,8
über 100	0,5
über 100	0,5
225	0,9
175	0,8

Vergleich mit dem Rattenwachstumstest: Die erhaltenen Werte wurden mit dem Rattentest verglichen. Junge Ratten erhielten eine Kost aus 90 Teilen poliertem Reis, 3 Teilen Casein, 3 Teilen Salz, 0,5 Teilen Lebertran und 7 Teilen Hefe (5 Stunden bei p_H 5 auf 120° erhitzt). Nach Eintritt des Gewichtsstillstandes wurde der oben dargestellte Extrakt aus Reis verfüttert (Pipette oder Sonde), und zwar wurde die Lösung so eingeengt, daß in 0,1—0,2 ccm der Extrakt aus 3—14 g Reis enthalten war. Im Parallelversuch wurden verschiedene Dosen des internationalen Standards gewertet. Es ergab sich aus diesem Vergleich folgendes Bild für die beschriebenen 6 Reissorten:

Tabelle 65

g Reis pro Rattendosis	mg Vitamin in 500 g Reis im Rattenwachstumstest
6	0,9
3	1,7
12	0,4
10	0,5
6	0,9
7	0,7

Der Vergleich zeigt also, daß die Auswertung nach den beiden Methoden übereinstimmende Werte ergibt, wenn in beiden Fällen nach einem Standardpräparat getestet wurde.

5. Der Rattenwachstumstest von Chick und Roscoe 31)

Der Test beruht auf der Erscheinung, daß bei B_1-arm ernährten Ratten nach einiger Zeit Wachstumsstillstand auftritt, der sich spezifisch durch Zufuhr von Vitamin B_1 beheben läßt. Auf die Bedeutung der genügenden B_2-Versorgung wurde bereits oben hingewiesen.

Man verwendet junge, wachsende Ratten im Gewicht von 40—50 g, die in Einzelkäfigen gehalten werden oder die man während der Vorperiode wurfweise zusammenläßt. Die Tiere erhalten eine der B_1-freien Kostformen und Wasser ad libitum. Als B_2-Zulage dient autoklavierte Hefe. Die Ratten werden wöchentlich zweimal gewogen. Die Vorperiode bis zum Eintritt des Gewichtsstillstandes dauert etwa 25 Tage (auf der Diät P 2 L 3—5 Wochen, auf der Diät FL etwa 2—3 Wochen).

Die Versuchsperiode beginnt, wenn die Tiere bei zwei aufeinanderfolgenden Wägungen nicht mehr an Gewicht zunehmen oder schon abnehmen. Man teilt dann

31) Chick c. s., Biochemic. J. 23, 489 (1929); 24, 1744 (1930); 22, 790 (1928); 26, 1223 (1932).

die Ratten in Gruppen auf, die einander möglichst gleichwertig zusammengesetzt sind. Es werden pro Dosis der zu untersuchenden Substanz nach Sherman-Spohn 10 Tiere benötigt. Für die Auswertung einer Substanz muß man also mit 6—8 Würfen rechnen. Das Gewicht der Tiere zu Beginn der Versuchsperiode soll im Durchschnitt 75 g betragen. Die Grenzen sind möglichst eng zu stecken, indem zu leichte oder zu schwere Tiere verworfen werden. Die zu prüfenden Substanzen werden mit wenig Futter angerührt verabreicht oder mit der Pipette gegeben.

Die Versuchsdauer beträgt 5—8 Wochen. Sherman-Spohn **32)** bevorzugen den 8-Wochen-Versuch, während Chick und Mitarbeiter mit 5 Wochen auskommen. Es ist im allgemeinen zu empfehlen, den Versuch nicht zu sehr auszudehenn, da nach einigen Wochen die Gewichtskurve Unregelmäßigkeiten zeigt und sogar Gewichtsverluste vorkommen können. Das ist namentlich bei der Auswertung reiner Präparate der Fall. Man nimmt an, daß es sich hierbei um das Fehlen eines weiteren von der Ratte benötigten Wachstumsfaktors handelt.

Die Auswertung erfolgt meist unter Umgehung der ersten Versuchswoche, da während dieser Zeit die Gewichtszunahmen noch reichlich ungleichmäßig sind. Bewertet werden meist die folgenden 4—5 Wochen. Als internationale Einheit Vitamin B_1 gilt diejenige Menge, die einen Gewichtsanstieg von 10—14 g pro Woche verursacht. Die internationale Einheit ist gleich einer Rattenwachstumseinheit oder gleich 2—3 Taubentagesdosen.

Chick und Roscoe setzen die Einheit als diejenige Menge fest, die in 5 Wochen eine Gewichtszunahme von 50—60 g hervorruft.

Guha und Drummond **34)** nehmen als Einheit diejenige Menge, die in 2—4 Wochen eine Gewichtszunahme von 10—12 g pro Woche gibt.

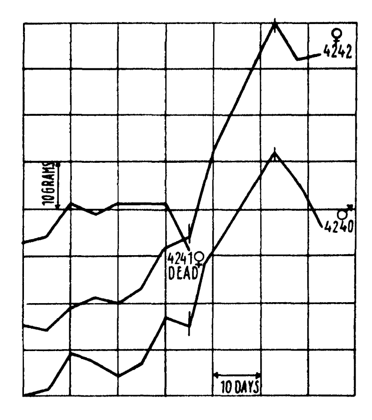


Abb. 73. Gewichtskurve von Ratten auf der Sherman-Spohn-Kostmischung. Zulage von 0,5 g autoklavierter Hefe vom 15. Tage an. Die Tiere 4242 und 4240 erhielten vom 35.—53. Tag eine B_1-Zulage. (Nach Williams.)

Der internationale Standard ist ein Fullererdeadsorbat des Vitamins aus Reisschalen, das in einer Menge von 10 mg pro die einen Gewichtsanstieg von 10—14 g pro Woche verursacht. 10 mg entsprechen also 1 E.

Nach dieser Auswertung hat Hefe pro Gramm etwa 16—18 internationale Einheiten, während Weizenkeime etwa 8 E. pro Gramm besitzen. Die internationale Einheit bezieht sich auf einen Fünfwochenversuch (Tabellen 66 u. 67).

Kemmerer-Steenbock **35)** fanden neuerdings mit 10 mg des Standards bei ihren Ratten eine wöchentliche Gewichtszunahme von 11,8 g.

6. Der prophylaktische Test

Der Rattenwachstumstest liefert auch in der prophylaktischen Form gute Werte. Natürlich muß hier für genügend umfangreiche Kontrollversuche gesorgt werden.

---

32) Sherman c. s., Amer. J. chem. Soc. 45, 2719 (1923); J. of biol. Chem. 74, 107 (1927). — Scheunert c. s., Biochem. Z. 113 (1927).
34) Guha-Drummond, Biochemic. J. 23, 880 (1929).
35) Kemmerer-Steenbock, J. of biol. Chem. 103, 361 (1933).

Tabelle 66. Comparative (antineuritic) vitamin B_1 value of (a) the standard adsorption product from rice polishings, (b) dried yeast, (c) wheat embryo, and (d) Peter's antineuritic concentrate from yeast (Vitamin B_2 supplied as autoclaved yeast extract, daily dose ≡ 0,5 g. yeast (dry wt.))

Material	Daily dose g.	No. of rats used	Av. weekly increment in weight during 5 weeks' observation g.	Av. weekly increment in growth during 1 st week g.	5 th week g.
a) International Standard . . .	0,025	1	16,2		
	0,012	6	14,3	15,0	13,5
	0,009	4	11,5	15,0	8,2
	0,006	4	7,7	8,5	6,5
International Standard after	0,010	2	11,4	19,0	9,0
10—12 months in refrigerator	0,0075	2	9,7	13,0	4,0
International Standard after	0,010	2	10,6	14,5	11,0
10—12 months at 37°	0,0075	2	8,1	14,0	5,0
b) Dried yeast	0,10	3	17,5	17,5	12,0
	0,075	5	14,6	17,2	11,0
	0,05	5	10,9	9,7	11,5
c) Wheat embryo	0,20	4	16,4	17,0	10,0
	0,15	4	15,2	17,7	9,2
	0,10	6	10,3	13,5	7,2
	cc.				
d) Peters's antineuritic concentrate from yeast	0,10	4	17,2	18,0	17,0
	0,075	2	17,4	21,0	15,0
0,1 cc. = 0,6 g. yeast dry weight)	0,05	3	15,4	17,7	11,0

Tabelle 67. Comparison of (antineuritic) vitamin B_1 assay using basal diets containing egg-white (diet E.L.) and autoclaved yeast (diet P.Y.) respectively as sources of vitamin B_2

s. Exp.	Material	Daily dose	Litter	Rat	Body wt, g.	Diet	Weekly increase in wt, g.	Av.
1	Yeast Fraction X_5	Equiv. to 0,12 g. dry yeast	1184	410♀	50	E.L.	13, 16, 12	14
			,,	414♀	51	P.Y.	17, 12, 16	15
2	,, XI_2C	,, 0,25 ,,	1173	397♀	59	E.L.	9, 14	11,5
			1184	406♂	61	P.Y.	11, 14	12,5
3	,, XIIC	,, 0,25 ,,	1184	409♀	45	E.L.	21, 13, 14	16
			1173	396♀	39	P.Y.	16, 13, 7, 10	11,5
4	,, XIICa	,, 1,0 ,,	1118	373♀	49	E.L.	22	22
			1117	361♂	43	P.Y.	23, 34	28
5	,, XII_5	,, 0,12 ,,	1118	368♂	51	E.L.	20, 17, 11, 15, 14	15
			1117	360♂	40	P.Y.	18, 17, 7, 17, 11	14
6	,, XII_3C	,, 0,25 ,,	1291	462♂	46	E.L.	15, 18, 20, 21	18,5
			1298	470♂	41	,,	17, 13, 18, 15	16
			1291	459♂	61	P.Y.	26, 21, 18, 13	19,5
			1298	468♂	54	,,	28, 10, 18, 15	18
7	Dried egg yolk	0,5 g. = 1,9 fresh	1291	464♀	40	E.L.	2, 2, 1	2
			,,	461♀	51	P.Y.	7, 3, —1	3
	,,	1,0 g. = 3,9 fresh	1291	465♀	38	E.L.	16, 18, 13, 8	14
			1298	466♂	72	P.Y.	26, 19, 12, 9	18,5

Ratten mit einem Gewicht von 40—50 g erhalten eine der oben beschriebenen B_1-freien Kostmischungen und Wasser ad libitum. Die Tiere werden 2mal wöchentlich gewogen und vom ersten Versuchstage an mit der zu prüfenden Substanz behandelt. Haltung und Pflege der Tiere ist dieselbe wie oben.

Um einen Vergleich mit einem Standard zu ermöglichen, wird ein Parallelversuch mit gleichwertigen Tieren angestellt, die eine Dosis eines B_1-Präparats bekannter Wirksamkeit erhalten.

Sherman-McArthur (l. c. 32) nehmen Tiere im Alter von 28—29 Tagen und eine Versuchsperiode von 8 Wochen (56 Tage). Das Testergebnis war in ihren Versuchen dasselbe, ob eine Vorperiode eingeschaltet wurde oder nicht, d. h. ob kurativ oder prophylaktisch ausgewertet wurde. Sherman und Mitarbeiter fanden die besten Ergebnisse bei einem 8-Wochen-Versuch, wenn die Gewichtszunahmen sich etwa bei 10 g hielten (für die Zeit von 8 Wochen!!). Tiere mit höherem Anfangsgewicht nehmen weniger zu als leichtere. Weibliche Tiere zeigen kleinere Zunahmen als männliche. Sherman fand z. B. in 8 Wochen eine Gewichtszunahme von 11,32 g für männliche Tiere und eine solche von 8,47 g für weibliche Tiere. Beide Gruppen erhielten dieselbe Vitamindosis (Abb. 74).

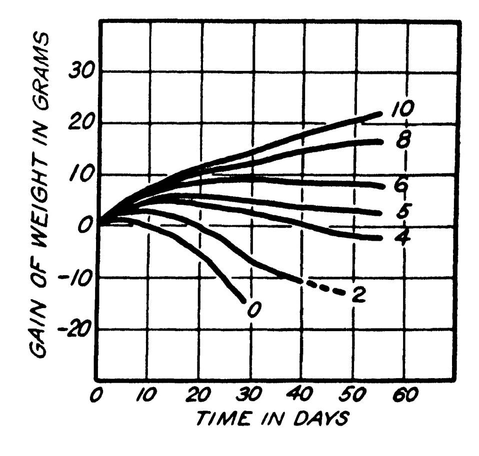


Abb. 74. Gewichtskurven von Ratten, die auf einer B_1-freien Kost täglich steigende Dosen Tomatensaft erhielten. (Auswertung des B_1-Gehalts von Tomatensaft.) (Nach Sherman.)

7. Der „maintenance“ oder Taubenwachstumtest

Der Taubenwachstumtest ist eine wenig genaue Auswertungsmethode. 1 Einheit ist danach diejenige Dosis, die bei Reisfütterung Temperatur und Gewicht der Tauben konstant hält. Eine Einheit ist etwa 6—24mal kleiner als die TTD, je nach den Versuchsbedingungen.

Bedeutend verbessert wurde die Methode von Klotz **36)**. Er ging von der Vorstellung aus, daß Reis allein auf die Dauer keine genügende Nahrung für die Taube ist. Ein Gewichtstest ist aber nur bei vollwertiger Diät brauchbar. Klotz füttert deshalb Tauben mit einer in jeder Beziehung vollwertigen Kost, in der nur das Vitamin B_1 fehlt. Vitamin B_2 wird von der Taube nicht benötigt und kann vernachlässigt werden.

Das erste Zeichen des B_1-Mangels der so gefütterten Tauben ist Anorexie. Die Tauben werden täglich gewogen. Wenn sie 5 Tage nacheinander nicht mehr an Gewicht zunehmen oder schon abzunehmen beginnen, bricht man die Vorperiode ab und füttert die zu prüfende Substanz. Die Tiere erhalten weiter dieselbe Diät und Wasser ad libitum. Als eine Taubeneinheit bezeichnet man diejenige Dosis, die täglich verabreicht 10—14 Tage lang das Gewicht der 300 g schweren Tiere konstant erhält. Waren die Tauben leichter oder schwerer als 300 g, so kann die gefundene Dosis nach der Formel von Klotz, die eine Beziehung zwischen Körpergewicht und Vitaminminimum darstellt, umgerechnet werden. Danach ist:

$$\text{Vitamin} = \text{K} \cdot \text{Gewicht}^{\frac{5}{3}}.$$

---

36) Klotz c. s., J. of biol. Chem. 94, 765 (1931/32); Amer. J. Physiol. 81, 470 (1927); Thesis Yale University 1926.

Tabelle 68. **Assay Data for Antineuritic Vitamin B Concentrate I-A**

Pigeon 89		Pigeon 86		Pigeon 83	
Dose	Daily body weight	Dose	Daily body weight	Dose	Daily body weight
cc.	gm.	cc.	gm.	cc.	gm.
0	311	3,0*)	238	0	328
	310				327
	Sunday	2,0	251		Sunday
	296				319
	287	1,0	260		318
					311
0,5	(287) **)	0,5	272		
	289		286	0,2	(311) **)
	298		308		309
	301		Sunday		316
	313		310		322
	Sunday		319		Sunday
	314		320		
			317	0,1	(Sunday)
0,2	(314) **)				318
	322	0,2	(317) **)		317
	324		323		313
	319		Sunday		320
	323		327		322
	328		336		317
	Sunday		330		Sunday
			326		320
0,1	(Sunday)		343		328
	324		344		318
	327		Sunday		
	327			0	(318) **)
	327	0,1	(Sunday)		319
	—		344		309
	—		347		302
	Sunday		343		Sunday
	327		347		298
	338		350		

Concluded

0	(338) **)		—		
	315		Sunday		
	313		337		
	309		342		
	305				
	Sunday	0	(342) **)		
			332		
			332		
			323		
			325		
			Sunday		
			311		
			304		
			297		

*) Dose administered to cure neuritic symptoms.

**) Each weight given is that measured on the day following the administration of a given dose; if the dose had any effect, one would expect to notice this on the

Für jede auszuwertende Dosis nimmt man mindestens 3 Tiere, die in besonderen Käfigen, in denen eine Erhöhung des Stoffwechsels durch zu große Bewegung unmöglich ist, gehalten werden (Plimmer-Rosedale-Raymond **37**)).

Plimmer c. s. fordern von einer wirksamen Substanz, daß sie auf B_1-freier Kost 26 Wochen lang das Gewicht der Tiere konstant erhält. Sie nehmen eine Diät, die zur Hauptsache aus Reis und Fischmehl besteht. Hefezulage von 4% hält 26 Wochen lang das Gewicht der Taube auf derselben Höhe. Auch nach der Methode von Block, der außer Reis Fleischabfälle gibt, können die Tiere bei Zugabe von Vitamin B_1 lange Zeit gewichtskonstant gehalten werden. Ein Beispiel nach Block geht aus Tabelle 68 hervor.

Block und Mitarbeiter konnten die Einwände, die namentlich von Carter, Kinnersley und Peters gegen die Spezifität der Methode erhoben wurden, nicht anerkennen. Danach sollte die Methode für den B_1-Mangel nicht spezifisch sein, sondern für eine weitere von der Taube für „Gewichts-maintenance" benötigte Substanz.

Carter und Mitarbeiter **37a**) fütterten Tauben mit Reis unter Zugabe von Lebertran und bestimmten dann diejenige Vitamin B_1-Menge, die das Gewicht der Tiere 30—35 Tage lang konstant erhält (bei täglicher Verabreichung mit einer täglichen Gewichtsdifferenz von ± 1 g). Sie geben an, daß Reisfütterung für den maintenance-Test ausreichend ist, wenn er nicht länger als 30 Tage ausgedehnt wird. Carter und Mitarbeiter fanden die Dosis an Marmite, die ihren Forderungen entsprach, in 1 g pro die. Diese Menge enthielt 4,3 kurative TTD. Wurde dieselbe Vitaminmenge in Form eines hochgereinigten Präparats gegeben, so trat keine Wirkung ein. Dagegen gelang es durch Verfütterung einer nicht mehr B_1-haltigen Fraktion das Gewicht konstant zu halten. Es geht daraus hervor, daß der maintenance-Test auf Reisnahrung für die Auswertung des Vitamins B_1 unspezifisch ist. Er ist vielleicht für Vitamin B_5 (?) brauchbar.

Tabelle 69. Assay Data for Antineuritic Vitamin B Corrected to Apply to a 300 Gm. Pigeon

Test product	Pigeon No.	Average body weight over test period	Minimum dose: Measured	Minimum dose: Corrected for 300 gm. pigeon
		gm.	cc.	cc.
Concentrate I-A	89	328	0,1	0,086
	86	344	0,1	0,080
	83	319	0,1	0,090
Average				0,085
Concentrate I-B-4	89	281	1,2	1,34
	51	300	1,4	1,40
	63	277	1,0	1,60
	86	299	1,5	1,50
Mean			1,27	1,46
Average deviation			0,18	0,12
„ „ in per cent of mean			14	8,2
Corrected dose taken for comparison with results of assays of other preparations . .				1,5

following day rather than the same day. The weight enclosed in parentheses is that for the same day the new dose was begun; this weight was taken just before administering the test material.

37) Plimmer c. s., Biochemic. J. 21, 1140 (1927); 17, 787 (1923); 23, 546 (1929).
37a) Carter c. s., J. Physiol. 68 (1929).

Die Methode ist trotzdem angeführt, weil erstens sehr viele Nahrungsmittel damit ausgewertet wurden und weil sie zweitens ein gutes Beispiel dafür ist, wie ein Test bei weitgehender Reinigung der wirksamen Substanz seine Spezifität einbüßen kann.

Tabelle 70. Wheat

Date	Time in weeks	Diet			Weights, g.		Number of eggs	Result
		Wheat	Rice	Fish-meal	Cock No. 17	Hen No. 18		
26. iii. 24		90	0	5	440	365	4 in Apr., May	2 hatched and reared; 2 deserted
to								
28. v. 24	10							
29. v. 24		80	10	5	430	370	2 in June	Both hatched and reared
to								
23. vii. 24	8							
24. vii. 24		70	20	5	425	365	4 in July, Aug.	2 hatched and reared; 2 deserted
to								
3. ix. 24	6							
4. ix. 24		60	30	5	440	365	14 in Sept., Oct., Nov., Jan., Feb., Mar., Apr.	4 unfertile; 10 addled and deserted
to								
7. iv. 25	31							
8. iv. 25		70	20	5	450	385	2 in May	1 unfertile; 1 fertile, deserted
to								
6. v. 25	4							
7. v. 25		75	20	5	445	380	4 in May, June	1 very small egg; 2 unfertile; 1 addled. Hen died; no particular symptoms
to								
17. vi. 26	6							
					No.	118		New hen
1. vii. 25		75	20	5	400	335	12 in July, Oct., Feb., Mar., May	1 addled; 2 hatched and reared; 2 hatched and died in 2nd week with enlarged hearts; 4 deserted; 2 dead in shell; 1 hatched, died in 2nd week with polyneuritis
to								
26. vi. 26	51				430	365		
27. vi. 26		60	35	5			7 in June, July, Aug., Sept.	5 deserted, fertile; 2 dead at hatch
to								
29. ix. 26	14				450	415		
30. ix. 26		30	65	5			2 in Oct.	Deserted, fertile. Hen died on 31, xii. 26 after 13 weeks. Cock died of polyneuritis
to								
7. iii. 27	23				350			
					No. 25/2	No. 25/3		
18. xi. 25		50	45	5	440	445	8 in Febr., Apr., June, July	1 dead in shell; 1 hatched and reared; 1 hatched and died; 5 fertile and deserted
to								
29. ix. 26	45				415	465		
30. ix. 26		75	20	5			9 in Oct., Feb., Mar., Apr., May	8 fertile and deserted; 1 unfertile
to								
25. v. 27	34				435	460		
					No. 93	No. 26/27		
10. iv. 27		40	55	5	455	380	6 in Apr., May, June	1 hatched and reared, but very poor growth; 2 unfertile; 3 fertile and deserted
to								
17. viii. 27	23				385	295		

8. Der Test von Plimmer*)

Plimmer und Mitarbeiter bestimmen das Vitamin B_1 verschiedener Nahrungsmittel, die nur wenig Vitamin enthalten, nach einer besonderen Methode. Soll z. B. der Gehalt des Weizens an Vitamin B_1 bestimmt werden, so erhalten ausgewachsene Tauben Weizen als Hauptnahrung und dazu 5 % Fischmehl.

Man setzt immer ein Paar zusammen und beobachtet das Verhalten der Tiere, die Gewichtskurve und die Reproduktion. Der Test ist dann positiv, wenn die Tiere auf der Kost gut gedeihen und sich vermehren. War das z. B. mit 95 % Weizen der Fall, dann folgt ein zweiter Versuch, wobei man nun 10 % des Weizens durch polierten, autoklavierten Reis ersetzt. Die Kost enthält dann nur 80 % Weizen. War auch dieser Versuch positiv, so verdünnt man die Kost mit Reis immer weiter, bis man schließlich zu einer Verdünnung kommt, bei der die Tiere weder wachsen noch sich vermehren. Als Verdünnung kann man statt Reis auch Weizenstärke nehmen. Die Kost wird in Pillenform gegeben.

An Weizen genügen für „maintenance" als Minimum 40 % der Diät, für „Reproduktion" dagegen sind 75—80 % erforderlich. Ein Beispiel geht aus Tabelle 70 hervor. Daraus ist auch ersichtlich, daß die Dauer dieses Versuches, gemessen an anderen Methoden, erheblich ist.

Plimmer und Mitarbeiter 38) haben nach dieser Methode fast alle Getreidearten untersucht. Eine zusammenfassende Tabelle sei gebracht:

Tabelle 71

	Percentage quantity of foodstuff required for	
	Rearing	Maintenance
Oatmeal	More than 95	95
Sussex ground oats	More than 95	95
Whole oats	95	95
Barley (whole) . .	65	55
Rye (whole) . . .	50—55	45
Whole wheat flour .	75—80	40—50
Wheat germ . . .	More than 10	6
Bran	—	33
Middlings.	—	33
Maize (kibbled) . .	75	50—60
Maize germ-meal .	Contain very little vitamin B	
Maize gluten . . .	Contain very little vitamin B	
Buckwheat	80	70
Millet	55	50
Dari	60	50
Dried yeast . . .	—	4
Baker's yeast . . .	—	10—12
Marmite	—	8—10

9. Der Herztest auf Vitamin B_1 *)

Der Herztest beruht auf der Erscheinung, daß Ratten auf einer B_1-freien Kost während der Avitaminose eine schwere Sinusbradykardie entwickeln, die durch Zugabe des Vitamins sofort zu beheben ist.

Junge Ratten werden auf die oben beschriebene Kost gesetzt und hören nach etwa 2 Wochen auf zu wachsen. Zu gleicher Zeit tritt die Herzschädigung ein. Die Pulsfrequenz, die normal 500 beträgt, sinkt auf 250—300. Durch Injektion einer B_1-wirksamen Substanz ist die Störung in 3—4 Stunden behoben. Die Herzstörung hat nichts mit der Futtereinnahme zu tun. Am besten reduziert man aber die tägliche Einnahme der Ratte auf etwa 4—6 g.

*) Spezifität zweifelhaft.

38) Plimmer und Mitarbeiter, Biochemic. J. 21, 1140 (1927).

Nach einer Heilung, die etwa 3—4 Tage dauert, fällt die Pulsfrequenz wieder und kann durch erneute Zulage der zu prüfenden Substanz gehoben werden. Ein typisches Beispiel der Auswertung geht aus Abb. 75 hervor.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß steigende Dosen auch steigende Wirkungen entfalten. Im einzelnen geht daraus hervor, daß bei Tier 1 und 2 nach intraperitonealer Injektion von 0,15 ccm des Konzentrates die Pulsfrequenz 2 Tage lang normal bleibt, während nach oraler Gabe derselben Menge nur 1 Tag lang normale Werte gefunden wurden (Nr. 4 und 5). Die Ratten 4, 2 und 5 erhielten die Dosen 0,3, 0,7 und 0,03 ccm. Am folgenden Tag stieg die Frequenz auf 500, 430 und 410.

Die Technik der Elektrokardiographie ist in den Arbeiten von Drury und Mitarbeitern 39) genau beschrieben. Das Tier wird in bestimmter Weise befestigt. Die

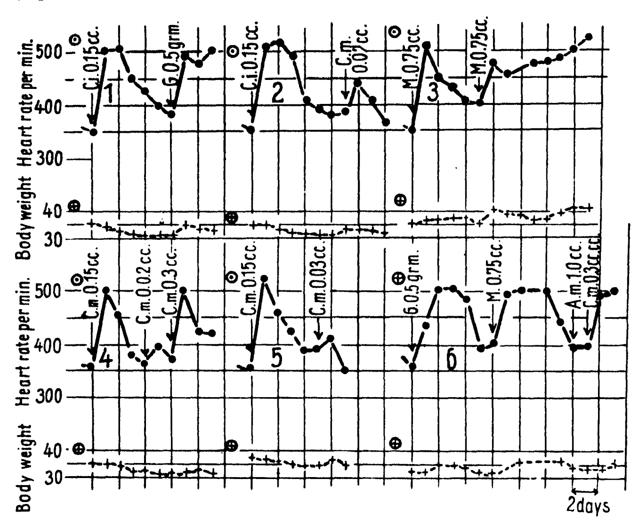


Abb. 75. Pulsfrequenz von Ratten vor und nach Verabreichung einer einzelnen Dosis Vitamin B_1.

Cm = perorale Verabreichung, Ci = intraperitoneal, G = Weizenkeime, M = Marmite, Am = Marmite autoklaviert. Die Kreise vor jeder Kurve bedeuten die normalen Werte vor Beginn der Mangelkostfütterung. (Nach Drury c. s.)

Messung geschieht mittels Nadelelektroden. Der Test wurde bisher als spezifisch für das Vitamin B_1 angesehen, da autoklavierte Hefe oder Hefeextrakte nicht mehr ansprachen. Nach neueren Untersuchungen muß an der Spezifität gezweifelt werden. Es scheint vielmehr, daß die Herzstörung für das Fehlen des Vitamins B_4 typisch ist und durch Zufuhr dieses Vitamins behoben werden kann. Danach wäre dieser Test also für Vitamin B_4 gültig.

10. Der Temperaturtest *)

Nach Cramer und Mottram 40) ist die Senkung der Körpertemperatur der Ratte auf einer B_1-armen Kost und die mit der Heilung der Avitaminose einsetzende Steigerung ein weit empfindlicherer Indikator für An- und Abwesenheit des Vitamins B_1 als das Verhalten des Gewichts.

Junge Ratten werden mit einem Gewicht von 70—100 g ausschließlich mit einer B_1-freien Kost, die aus Casein, Stärke, Olivenöl und Salz unter Zugabe von Lebertran besteht, gefüttert und wöchentlich Temperatur und Gewicht festgestellt. Dabei

*) Spezifität zweifelhaft.

39) Drury-Harris-Maudsley, Biochemic. J. 24, 1632 (1930). — Carter-Drury, J. of Physiol. 68 I (1929).

40) Cramer-Mottram, Lancet 2, 1093 (1927).

wird die Temperatur stets um dieselbe Tageszeit gemessen. Die Tiere werden in einem temperaturkonstanten Raum gehalten. (Wichtig!) Ist die Temperatur auf 36° gefallen, wird die zu untersuchende Substanz gefüttert.

Kehrt die Körpertemperatur innerhalb 2 Wochen nach Beginn der Dosierung auf normale Werte zurück, so wird das Ergebnis als vollkommene Heilung gewertet. Wurde die normale Temperatur aber erst nach einer Periode von mehr als 2 Wochen erreicht, gilt der Versuch als mäßige Heilung. Tritt keine Temperaturerhöhung ein, ist der Versuch negativ. Bei den Untersuchungen gilt die Gewichtskurve als Kontrolltest. Gewichtskurven und Temperaturkurven laufen vollkommen parallel. Für jede auszuwertende Dosis braucht man 3 Tiere. Außerdem werden positive und negative Kontrollen angesetzt. Ein Beispiel sei in folgender Abbildung gebracht.

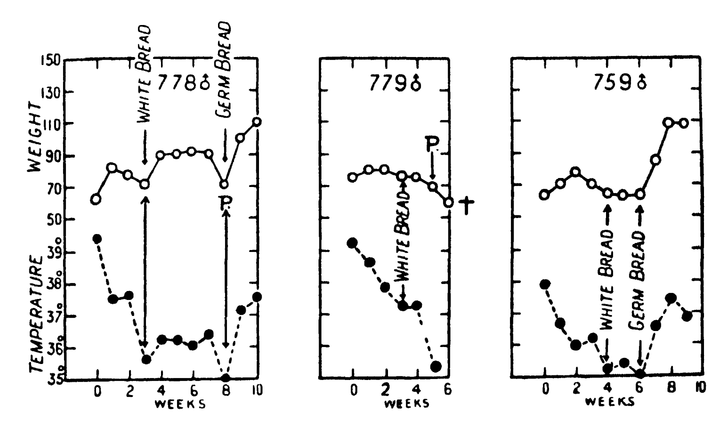


Abb. 76. Beispiel zum Temperaturtest. (Nach Cramer c. s.)

11. Weitere Testmethoden, die für die Auswertung des Vitamins B_1 angewandt wurden

1. Methode von Sure 41)

Sure benutzt für die Auswertung des Vitamins B_1 säugende Ratten und stellt diejenige Menge fest, die bei säugenden Ratten mit einem Gewicht von etwa 30 g während 7—10 Tagen eine Gewichtszunahme von 10 g verursacht. Diese Menge ist eine Einheit. Die Tiere erhalten während der Versuchszeit und auch vorher eine Standardkost. Die Methode wird zur Auswertung des Vitamins B wenig gebraucht.

2. Methode von Orr-Owing-Reader 42)

Die Methode beruht auf dem Wachstum von Streptothrix Corallinus, das durch B_1 spezifisch gefördert werden soll. Es hat sich aber gezeigt, daß, obgleich unreine Präparate damit auswertbar sind, kristallisierte Präparate des Vitamins B_1 sich nicht werten lassen. Der wachstumsfördernde Faktor ist mit dem Vitamin B_1 nicht identisch. Dasselbe gilt für die älteren Methoden, die mit Hilfe des Hefewachstums B_1 nachweisen wollten (vgl. Bios).

3. Der Test von Passmore 43)

Der Nachweis beruht auf der Erscheinung, daß das „Katatorulin" die Sauerstoffaufnahme des Gehirnbreis avitaminotischer Tauben erhöht, und zwar geht die Erhöhung der anwesenden Menge parallel. Da auch die reinsten kristallinischen Präparate diese Wirkung geben, ist das „Katatorulin" wahrscheinlich mit dem Vitamin identisch. Die Bestimmung wird in der Warburg-Apparatur ausgeführt.

41) Sure, J. of biol. Chem. 76, 673 (1928).
42) Orr-Owing-Reader, Biochemic. J. 22, 440 (1928).
43) Passmore, Biochemic. J. 27, 842 (1933).

4. Methode von Spruyt 44)

Zum Nachweis des Vitamins B_1 wird die Phosphorwolframsäurefällung eines schon weitgehend gereinigten Vitaminextrakts als Maß herangezogen. Die Menge des Niederschlags wird durch Zentrifugieren im Hämatokrit bestimmt. Nachprüfungen liegen nicht vor.

III. Der Vitamin B_1-Standard 45)

Als Standard gilt ein Fullererdeadsorbat aus Reisschalen. 10 mg dieser Fullererde entsprechen 1 internationalen Einheit.

1 Taubentagesdosis im kurativen Test ist gleich 2—3 internationalen Einheiten. 1 Rattenwachstumseinheit ist gleich 1—2 internationalen Einheiten.

Das Fullererdeadsorbat wird wie folgt hergestellt:

100 kg Reisschalen werden mit Wasser extrahiert, der Extrakt mit Schwefelsäure auf $p_H = 4{,}5$ gebracht, mit Salicylsäure zu 0,2 % und Toluol versetzt, nach 2 Tagen filtriert und mit 3 kg Fullererde 1 Tag geschüttelt. Die Fullererde wird abfiltriert, mit Wasser und Alkohol gewaschen und getrocknet.

Jung, der die einzelnen Einheiten der Testversuche miteinander verglich, fand folgende Werte:

1 kurative Ratteneinheit (erwachsene Ratte) wird als Rattentagesdosis (RTD.) bezeichnet.

1—2 solcher RTD. entsprechen 1 kurativen Taubentagesdosis,
1—3 ,, ,, ,, 1 Rattenwachstumseinheit,
2—8 ,, ,, ,, 1 prophylaktischen Taubentagesdosis,
1 ,, ,, entspricht etwa 1 Sherman-Einheit 46).

IV. Die Bildung des Vitamins B_1

Zur Vitamin B_1-Synthese sind nur Pflanzen befähigt. Samen verbrauchen während der Keimung ihren Vitaminvorrat. Bakterien sind gute Vitaminbildner. Darauf beruht die Erscheinung, daß der Vitamin B_1-Gehalt der Kuhmilch zu allen Zeiten von dem Vitamingehalt des Futters nahezu unabhängig ist. Das Vitamin wird im Pansen durch Bakterien synthetisiert.

Auch bei Versuchsratten konnte eine Vitaminsynthese im Verdauungskanal nachgewiesen werden. Bei dieser Erscheinung, die man „refection" nennt, entleeren die Tiere, wenn sie eine Zeitlang B_1-frei ernährt wurden, große Mengen eines weißen Kots und vermögen nun monatelang normal zu gedeihen. Auch die Jungen sind dann gegen den Vitaminmangel resistent. Durch Verfütterung des Kots an andere Tiere gelingt es, diese Resistenz zu übertragen.

Bei näherer Untersuchung zeigte sich, daß die weiße Farbe des Kots von Stärkekörnern herrührt. Es konnte festgestellt werden, daß rohe Stärke einen Mikroorganismus enthält, der zur Vitaminsynthese im Rattendarm in außerordentlichem Maße befähigt ist. Der Mikroorganismus ist nicht züchtbar, läßt sich aber aus der Stärke durch Extraktion, Kochen oder Erhitzen entfernen. Bei Tauben konnte

44) Spruyt, Dissertation. Amsterdam 1933.
45) Gesundheitskommission des Völkerbunds, Genf. Bericht der ständigen Kommission für biologische Standardisierung 1931.
46) Jung, Z. f. Vitaminforschg 1, 192 (1932).

gelegentlich eine ähnliche Erscheinung beobachtet werden. Es ist selbstverständlich, daß bei Vorliegen von Refektion jede Vitaminauswertung gestört wird. In solchen Fällen sind die nötigen Vorsichtsmaßregeln zu beachten (s. S. 166).

V. Der Vitamin B_1-Bedarf 47), 47a)

Der Vitamin B_1-Bedarf ist bei jungen Tieren größer als bei ausgewachsenen. Der B_1-Bedarf erwachsener Tiere ist dem Stoffwechsel der Gewebsmasse proportional. Der Vitaminbedarf ist gleich dem Produkt aus der 5/3-Potenz des Körpergewichts und einer Konstanten, die für jede Tierart spezifisch ist und nach einem bestimmten Verfahren ermittelt werden kann. Sie ist um so kleiner, je größer das Tier ist. Der Vitaminbedarf der Maus beträgt

$$\text{Bmg} = 0{,}15 \cdot \text{Gew.}^{5/3}.$$

Die Konstante beträgt für die Ratte 0,0099, für den Hund 0,000076 und für die Taube 0,0037. Im allgemeinen ist der B_1-Bedarf gleich der 2/3-Potenz des Körpergewichts. Muttertiere haben einen höheren Vitaminbedarf. Kostformen, die für ausgewachsene Ratten genügen, können zur Aufzucht junger Tiere unzureichend sein.

Alle bisher untersuchten Vögel benötigen Vitamin B_1. Der Bedarf der Taube beträgt etwa 75—100 mg Trockenhefe pro Tag. Hühner brauchen weniger. Ratten benötigen pro 100 g Gewicht etwa 50—60 mg Trockenhefe pro Tag. Weiter sind Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Affe u. a. auf die B_1-Zufuhr angewiesen. Dagegen können Rind, Ziege und Schaf auch in der Wachstumsperiode ohne B_1 auskommen. Erwähnt sei noch, daß das Vitamin auch für Fische, Amphibien und Insekten unentbehrlich ist.

Für Testversuche ist wichtig, daß Tauben etwa denselben Bedarf haben wie Ratten. Bei Kücken ist die Hefemenge, die optimales Gedeihen verbürgt, 6—10% des Futters, bei Tauben 4% und bei ausgewachsenen Ratten etwa 2%.

Der Vitamin B_1-Bedarf ist nicht immer für ein Tier konstant, sondern abhängig von der Kostzusammensetzung. Plimmer und Mitarbeiter berechnen die Menge an Trockenhefe, die benötigt wird, nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{Trockenhefe}}{\text{Kalorien}} = \frac{1}{40} - \frac{1}{50}.$$

Der Vitaminbedarf des Menschen beträgt etwa 100—150 Rattenwachstumseinheiten. Der Bedarf steigt mit der Kalorienzufuhr. 20 Kalorien benötigen 1 Rattenwachstumseinheit.

Neuerdings spielt der Beriberiquotient von Amantea 47b) eine gewisse Rolle. Er stellt eine Beziehung dar zwischen der B_1-Reserve eines Organismus, der Nahrungsaufnahme und der Gewichtsabnahme bei B_1-freier Ernährung. Man bestimmt ihn bei ½—2 Jahre alten Tauben, die man zunächst einige Tage (4 Tage) lang mit 30—35 g Körnern und 2 g Hefe pro die füttert, um die B_1-Depots aufzufüllen. Man wiegt die Tiere und gibt nun ausschließlich polierten gewässerten Reis. Die Reisaufnahme muß streng überwacht werden. Rückwiegen der nicht gefressenen Nahrung. Man wiegt wieder bei Eintritt der ersten Krampferscheinungen. Der Quotient beträgt

$$Q_B = \frac{\text{aufgenommene Nahrung} + \text{Gewichtsverlust}}{\text{Anfangsgewicht}}$$

47) Cowgill, Ber. Physiol. 69, 501 (1933).
47a) Hendricks, Amer. J. Physiol. 105, 678 (1933).
47b) Amantea, Atti Accad. naz. Lincei 18, 399 (1933).

VI. Vorkommen des Vitamins B_1

Tabelle 72

Substanz	Polyneuritis-heilende Dosis bei der Taube g oder ccm	Ratten-wachstums-einheiten pro g	Sherman-Einheiten pro g alte Sh.-Einheit	Wirksamkeit bezogen auf Weizenkeime = 100	Wirksamkeit bezogen auf Hefe = 100 maintenancetest
Trockenhefe	0,5—1,0	5—10	—	—	100
Bäckerhefe					33—40
Preßhefe		1,5		60	
Tikitiki	1,3—6,0				
Marmite					40—50
Weizenkeime	1,5—2,5			100	66
Weizenkleie				25	12—13
Weizen, ganz					8—10
Roggen					9
Gerste	3,7				7—8
Gerste, enthülst.	5				
Gerste, gekeimt	3				
Hafer					4—5
Hafermehl					4
Buchweizen					5—6
Mais					7—8
Reiskeime	0,5—1,0			200	
Reisschalen	10				
Malz	mehr als 5—10				
Vollkornmehl		0,6			
Vollkornbrot		0,4			
Erbsen, trocken				40	
Linsen		0,6		80	
Sojabohne					13
Nüsse		0,5—1,0			20
Spinat	}				
Erbsen	} 5,0 trock.	0,2—0,3	0,6—0,8		
Karotten	}		0,3		
Kohl			0,4—0,5		
Salat					
Bohnen			0,35		
Kartoffeln		0,1—0,15	0,3		
Tomaten			0,3—0,6	4,3	
Tomatensaft	27—30				
Gras		0,2—0,3			
Heu		1,0			
Grünkohl		0,65			
Rüben			0,3		
Spargel, frisch	2,2				
Bananen, Orangensaft		0,1			
Kuhmilch	3,5—35	0,1—0,15			
Ziegenmilch		0,1			
Frauenmilch		0,05			
Eigelb	1,5—3,0	0,5—1,0			
Eigelb, trocken		1,2		50	
Rindfleisch	5—20,0	0,25		11	
Herzmuskel	1,7—5,0				
Rindsleber	0,9—3,0	1,0—1,6		50	
Gehirn	1,2—6,0				

VII. Darstellungs- und Reinigungsmethoden des Vitamins B_1

Die im folgenden beschriebenen Methoden sind möglichst historisch geordnet, anfangend mit der Methode von Osborne-Wakeman, nach der zum erstenmal eine Anreicherung des antineuritischen Vitamins erfolgte. Die Methoden von Seidell, der die Adsorption des Vitamins an Fullererde einführte und später eine Behandlung mit Pikrinsäure und mit Benzoylchlorid einschaltete, sind nur teilweise angeführt, und zwar in der neuesten Fassung. Die Modifikation von Levene, die in der Adsorption an Silicagel besteht, wird ebenfalls beschrieben, die Methode von Janssen-Donath in der neuesten Form gebracht. Unter den neueren Verfahren, die auch eine Darstellung des Vitamins in kristallisierter Form gestatten, sind namentlich die Methoden von Kinnersley-Peters und Guha-Drummond erwähnt.

1. Darstellung eines Vitamin B_1-Konzentrats nach Osborne-Wakeman 48)

4,8 kg einer mit Eiswasser gewaschenen Brauereihefe (Naßgewicht) werden in 10 Liter Wasser, die 0,01 % Essigsäure enthalten, bei 100° eingetragen und 5 Minuten zum Sieden erhitzt. Man filtriert und wiederholt mit dem Heferückstand die Extraktion. Die Filtrate werden auf 2 Liter eingeengt und in 3 Liter 93 %igem Alkohol eingetragen (alkohol. Gew.-% der Lösung 53). Der Niederschlag (Fraktion 1) wird mit 53 %igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 35,9 g. Das Filtrat der ersten Fällung wird wieder auf 300 ccm eingeengt und mit 1,96 Liter 95 %igem Alkohol versetzt (Alkoholkonzentration 79 Gew.-%). Der Niederschlag (Fraktion 2) wird wie oben behandelt. Ausbeute 51,8 g. Zur Reinigung löst man den Niederschlag in 100 ccm Wasser und fällt die Lösung mit Alkohol bei einer Konzentration von 90 %. Die gesamte wirksame Substanz findet sich in Fraktion 2. Es genügen davon als tägliche Dosis für die Ratte schon 6,2 mg.

2. Darstellung eines Vitamin B_1-Konzentrats nach Seidell 49)

1. Methode: 3 kg Hefe werden in 26 Liter Wasser eingetragen und mit einer Lösung von 600 g NaOH in 4 Liter Wasser 4 Minuten lang gerührt. Die Lösung muß innerhalb 3—4 Minuten zentrifugiert und mit 900 ccm Schwefelsäure (1 Teil Säure zu 2 Teilen Wasser) und 1 Liter Alkohol versetzt werden. Die Reaktion der Lösung wird so eingestellt, daß 25 ccm davon gegen Methylrot 0,3 ccm n/NaOH verbrauchen.

Die aus 6 kg Hefe gewonnenen 60 Liter Extrakt werden im Vakuum auf 16 Liter eingeengt und 3 Tage bei 4° aufbewahrt. Vom Bodensatz zieht man 12,5 Liter klare Lösung ab und versetzt sie mit weiteren 4 Litern 95 %igem Alkohol. Nachdem die Lösung 1 Tag lang bei 4° aufbewahrt wurde, wird filtriert. Die erhaltenen 14,8 Liter Filtrat (von dem 5 ccm, 2,2 ccm n/NaOH gegen Methylrot verbrauchen sollen, was einem p_H von etwa 2,8—3,0 entspricht) werden wieder mit 4 Liter 95 %igen Alkohol gefällt und der Niederschlag nach 2tägigem Stehen bei 4° abfiltriert. Die Lösung wird im Vakuum zur Trockne verdampft. Es bleiben als Rückstand etwa 400 g eines gelben trockenen Pulvers, das 35 % Asche enthält und in Dosen von 20 mg pro die = 1,5 mg N wirksam ist.

2. Methode: 1600 g frische trockene Hefe werden in 12 Liter Wasser suspendiert (0,01 %ig an Essigsäure) und 24 Stunden lang gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und in derselben Weise noch einmal behandelt. Die Filtrate engt man vor einem elektrischen Erhitzer auf 5—6 Liter ein und rührt die Lösung mit 100 g Fullererde pro 1000 ccm 4—5 Stunden lang. Die Fullererde wird mit Wasser gewaschen und die Lösung erneut in derselben Weise mit Fullererde behandelt. Die vereinigten Filtrate enthalten das Vitamin B_2. Die Fullererde wird

48) Osborne c. s., J. of biol. Chem. 40, 383 (1919).

49) Seidell, J. of biol. Chem. 82, 633 (1929); 67, 593 (1926); 100, 195 (1933); J. Ind. Eng. Chem. 1921, 1111; J. amer. chem. Assoc. 1922, 2042.

mit einer konzentrierten Lösung von Bariumhydroxyd aufgeschwemmt, die Lösung sofort filtriert und mit Schwefelsäure neutralisiert. Die Fullererde wird nochmals in derselben Weise mit Baryt eluiert. Die Filtrate werden auf 1600 ccm eingeengt. 1 ccm entspricht 1 g Hefe.

3. Darstellung eines Vitamin B_1-Konzentrats nach Levene 50)

1. Methode: Eine Rohvitaminlösung, die 100 g Substanz in 4 Liter Wasser enthält (Acetonniederschlag aus Preßhefesaft) wird filtriert und mit 800 g Silicagel unter Rühren versetzt. Man stellt den p_H auf 3 ein. Nach 10 Minuten wird vom Silicagel abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen. Die Adsorption wird mit dem Filtrat wiederholt. Die Silicagelniederschläge werden in 6 Liter Wasser suspendiert, der p_H der Lösung mit LiOH auf 9,8 gebracht. Nachdem die Lösung 20 Minuten gerührt wurde, wird abfiltriert, das Filtrat mit HJ neutralisiert und auf 100 ccm eingeengt. Es bleibt im Eisschrank stehen, wird mit wenig Alkohol versetzt und filtriert. Das Filtrat wird weiter konzentriert und mit Aceton vollständig gefällt. Ausbeute an trockener Substanz 18—20 g. — 3 g dieses Pulvers werden in 100 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung von 100 ccm Alkohol und 1 ccm 70%iger HJ versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Alkohol gewaschen bis das Waschwasser J-frei ist. Der getrocknete Niederschlag enthält die wirksame Substanz. Er ist wirksam in täglichen Dosen von 0,1 mg bei der Ratte.

2. Methode: 50 Pfund Hefe, nicht gepreßt, werden 4 Stunden lang bei 60° mit 5 gallons (1 gallon = 4,54 Liter) 95%igem Alkohol behandelt, abfiltriert und das Filtrat auf 1 Liter eingeengt. Man versetzt die Lösung mit demselben Volumen 95%igem Alkohol und verwirft den Niederschlag. Zum Filtrat gibt man solange 98%igen Alkohol, bis die Lösung 80%ig ist. Der Niederschlag wird mit Alkohol und Aceton gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag enthält die wirksame Substanz. 30 mg pro Tag/Tier geben normales Wachstum. — 50 g dieser Substanz werden in 500 ccm Wasser gelöst, wenn nötig zentrifugiert und auf 4 Liter verdünnt. Die Lösung wird mit HJ auf p_H 3 gebracht und 15 Minuten lang mit 2 kg Silicagel gerührt. Man wiederholt mit dem Filtrat die Adsorption noch 5mal mit je 1 kg Silicagel. Die Filtrate werden vereinigt, nach der Neutralisation mit LiOH auf 100 ccm eingeengt und im Eisschrank aufbewahrt. Sie dienen zur Gewinnung des Vitamins B_2. Zu diesem Zweck versetzt man die Lösung mit 98%igem Alkohol bis zur Konzentration 80%, wäscht den Niederschlag und trocknet. Ausbeute 28—30 g. Das Präparat enthält Vitamin B_2. Wirksame Dosis 30 mg pro die. — Die Gewinnung des Vitamins B_1 aus dem Silicagel erfolgt aus der ersten Adsorption, indem man sie in Wasser suspendiert (p_H = 3 mit HJ) (4 Liter Wasser). Das Silicagel wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und erneut in 6 Liter Wasser suspendiert. Die Lösung wird mit LiOH auf p_H = 9,8 eingestellt und 15 Minuten gerührt. Man filtriert und engt das Filtrat nach Neutralisation mit HJ auf 75 ccm ein. Die Lösung wird mit 50 ccm 96%igem Alkohol versetzt und der Niederschlag nach Aufbewahrung im Eisschrank verworfen. Das Filtrat wird auf 40 ccm eingeengt und mit 40 ccm Alkohol versetzt. Nach Aufbewahrung der Lösung im Eisschrank über Nacht wird filtriert und das klare Filtrat in 1000 ccm Aceton eingetragen. Der Niederschlag wird abgetrennt, gewaschen und getrocknet. Ausbeute 6—7 g. Die Substanz enthält die gesamte B_1-Wirksamkeit. Für den Rattenwachstumstest genügen tägliche Dosen von 2,2 mg aschefreier Substanz.

4. Darstellung eines Vitamin B_1-Konzentrats nach Janssen-Donath 51)

2,5 kg Reiskeime werden 4 Stunden lang bei 60—70° auf dem Wasserbad mit 7,5 Liter 50%igem Alkohol (0,5%ig an Salzsäure) behandelt. Das Filtrat wird im

50) Levene, J. of biol. Chem. 95, 317 (1932); 79, 455 (1928); J. of Pharmacol. 1926, 227.

51) Janssen-Donath, Meded. Dienst. Volksgez. Neederl.-Indië 1, 186 (1927); Ber. Physiol. 60, 566 (1931). — Guha-Drummond, Ber. Physiol. 54, 311 (1930). — Williams-Waterman-Gurin, J. of biol. Chem. 87, 559 (1930). — Misawa, J. of Biochem. 15, 439 (1932).

Vakuum bei maximal 60° auf $^1/_{10}$ eingeengt. Man erhält einen gelbbraunen Sirup mit 40% Trockenrückstand. 1 Liter dieses Extraktes (etwa 5 kg Reiskeime) wird mit 9 Liter Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure auf $p_H = 4,5$ eingestellt und 30 Minuten lang mit 500 g Tonerde (acid clay) gerührt. Nach 3 Stunden wird abgehebert und die Tonerde mit Wasser vom $p_H = 4,5$ gewaschen. Je 50 g dieser Tonerde werden mit 200 ccm Baryt behandelt und das Filtrat sofort in Schwefelsäure aufgefangen (1 n). Das gelbbraune klare Filtrat des Bariumsulfatniederschlags wird auf 400 ccm eingeengt. Die Lösung enthält 9,6% Trockensubstanz. Vitaminausbeute = 80% des ursprünglichen.

800 ccm dieses Extrakts (etwa 10 kg Reiskeime) werden mit 45 ccm einer 50%-igen Silbernitratlösung gefällt und mit Baryt auf $p_H = 4,5$ gebracht. Das klare Filtrat wird auf $p_H = 6,5$ eingestellt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat dieser Fällung liefert bei $p_H = 8$ noch eine weitere Fällung. Der größte Teil der Wirksamkeit findet sich in der Fraktion $p_H = 6,5$. Der Niederschlag wird mit Salzsäure zerlegt. Ausbeute 10%.

Der Schwefelsäuregehalt der Lösung wird auf 5% gebracht und die Lösung mit überschüssiger Phosphorwolframsäure gefällt. Man löst den Niederschlag in 100 ccm 50%igem Aceton und filtriert die Lösung in 5%ige Schwefelsäure. Nach 36stündigem Stehen wird der Niederschlag in 60 ccm Acetonwasser gelöst und die Lösung mit Barytwasser zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Das Filtrat wird in Schwefelsäure aufgefangen und die Lösung mit Baryt genau neutralisiert. Nach Einengen im Vakuum erhält man 200 mg eines gelben Pulvers . Ausbeute 10%.

Das Pulver wird mit 250 ccm Alkohol extrahiert und das Filtrat mit 5—6 ccm Platinchloridlösung gefällt. Der Platinniederschlag wird in Salzsäure suspendiert, durch H_2S zerlegt und das zitronengelbe Filtrat nach Einengung der Kristallisation überlassen.

5. Darstellung eines Vitamin B_1-Konzentrats nach Salmon-Guerrant-Hays 52)

1. Methode: Weißer, fein gemahlener Mais wird bei 40—50° getrocknet und dann mit 80%igem Alkohol extrahiert bis aus 150 kg Mais etwa 225 Liter Extrakt bereitet sind. Sie werden im Vakuum auf 15 Liter reduziert, gekühlt und filtriert. Der Niederschlag wird mit Wasser geknetet, um anhaftendes Vitamin in Lösung zu bringen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und mit Wasser auf ein Volumen von 21,5 Liter gebracht. Die Lösung wird im Vakuum auf 15 Liter eingeengt und nach 24stündigem Stehen im Eisschrank filtriert. Das Filtrat wird mit Wasser auf 16,5 Liter verdünnt und die klare gelbe Lösung auf $p_H = 2,75$ eingestellt. Die Lösung wird 2 Stunden lang mit 3 g Fullererde pro Kilogramm Mais behandelt (alle 5 Minuten gut durchrühren), die Fullererde abfiltriert und 2mal mit 25 ccm 80%igem Alkohol je 30 g Fullererde, dann 2mal mit je 25 ccm 93%igem Alkohol gewaschen. Die Fullererde enthält die wirksame Substanz. Sie kann direkt im Taubenversuch ausgewertet werden. Meist erweist sich hier eine Dosis der Größenordnung 0,05 g als wirksam. Zu beachten ist bei Anwendung dieser Methode namentlich die Konstanthaltung des p_H der Adsorptionslösung. Er soll nach der Adsorption nie den Wert 4 übersteigen.

Darstellung aus Hefe: 8 Liter Wasser werden mit 0,75 Vol.-% Eisessig versetzt und auf 95° erhitzt. 2,5 kg Trockenhefe werden in die Lösung verrührt. Nach Abkühlen auf 60° gibt man 12 Liter 93%igen Alkohol zu, um das Eiweiß zu fällen und die Filtration zu erleichtern. Der Filterrückstand wird nochmals mit 4 Liter 51%igem Alkohol extrahiert und die beiden Filtrate vereinigt. Die Lösungen werden im Vakuum auf 6,6 Liter reduziert und nach 24stündigem Stehen im Eisschrank filtriert. Die klaren Lösungen werden auf $p_H = 3$ eingestellt, mit 180 g Fullererde pro Kilogramm Hefe versetzt und eine Zeitlang gut verrührt. Die Fullererde wird abfiltriert, 4mal mit je 25 ccm Wasser und 1mal mit 50 ccm 93%igem Alkohol gewaschen und getrocknet.

Das Filtrat der Fullererde kann weiter auf Vitamin B_2 aufgearbeitet werden.

52) Salmon c. s., J. of biol. Chem. 80, 91 (1928); 76, 487 (1928); 77. 483 (1927).

6. Die Methoden von Kinnersley und Peters 53)

Darstellung eines B_1-Konzentrats mit der Wirksamkeit von 5 mg als Tagesdosis

7 lbs Hefe (1 lbs = 453,29 g) werden 2mal mit soviel Wasser extrahiert, daß 2700 ccm Extrakt mit 100 g Trockensubstanz entstehen. Man gibt zur Lösung 280 ccm 25 %iges neutrales Bleiacetat und filtriert den Niederschlag ab. Das Filtrat wird mit Schwefelsäure versetzt (kongosauer) und mit 70 ccm Hopkinschem Reagens (Merkurisulfat in Schwefelsäure) gefällt. Das Filtrat wird mit 20 %iger Natronlauge auf $p_H = 5$ gebracht, eine etwa entstehende Fällung entfernt. Dann wird die Lösung zunächst mit 30 g, dann mit 10 g Norit je 10 Minuten gerührt und die Kohle abfiltriert. Man wäscht mit destilliertem Wasser. Die vereinigten Kohlenmengen werden mit 200 ccm, darauf mit 100 ccm 55 Vol.-%igem Alkohol, unter Zusatz von 1 ccm konzentrierter Salzsäure eluiert. Die alkoholischen Extrakte enthalten etwa 2,85 g organische Substanz. Die Lösung wird im Vakuum bei 60° auf etwa 5 ccm eingeengt und mit 45 ccm 97 %igem Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird mit 87 %igem Alkohol gewaschen. Die Wirksamkeit der Substanz ist etwa 5 mg Tier/Tag. Durch verschiedene Alkoholfällungen kann sie auf 1 mg Tag/Tier gesteigert werden (s. Original).

a) Darstellung eines B_1-Konzentrats mit der Wirksamkeit von 0,4 mg

14 lbs Hefe (1 lbs = 453,29 g) werden 3 Tage lang bei 15—20° aufbewahrt. Die Hefe wird in kleinen Portionen in 3500 ccm siedendes Wasser eingetragen und die Mischung danach 5 Minuten zum Sieden erhitzt. Die Hefe wird abfiltriert und nochmals in derselben Weise behandelt. Die vereinigten Filtrate, etwa 5600 ccm, werden mit 400 ccm 25 %igem neutralem Bleiacetat gefällt. Man filtriert durch große Faltenfilter (am besten über Nacht) ohne den Niederschlag auszuwaschen. Ausbeute 5000 ccm Filtrat. Man versetzt die Lösung mit 3—4000 ccm einer kalt gesättigten Barytlösung. Sollte dabei kein Niederschlag entstehen, gibt man noch etwa 12 ccm der Bleiessiglösung hinzu. Der Niederschlag wird möglichst schnell abfiltriert. Man erhält ein klares gelbes Filtrat, das in Schwefelsäure aufgefangen wird. Nach beendigter Filtration säuert man die Lösung mit Schwefelsäure (kongosauer) an und filtriert das ausgefallene Bariumsulfat ab. Etwa 10 Liter Filtrat. Die Lösung wird mit Natronlauge und Schwefelsäure auf $p_H = 2,5$ gebracht und mit 80 bis 100 ccm Merkurisulfat in Schwefelsäure (Hopkins-Reagens) gefällt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert. Sollte im Filtrat eine Fällung entstehen, wird sie nicht entfernt. Wichtig ist ein nicht zu großer Hg-Überschuß. 10 ccm der Lösung sollen mit 1 Tropfen Reagens keine dicke Fällung geben. — Das Filtrat der Hg-Fällung wird mit Natronlauge auf $p_H = 7$ gebracht und zunächst mit 60 g, dann mit 20 g Kohle verrührt (je 10 Minuten). Die Kohle wird mit destilliertem Wasser gewaschen und getrennt aufgearbeitet. Man eluiert mit einer Lösung von 200 ccm n/10 HCl auf dem Wasserbad. Das Filter wird mitextrahiert (Vorsicht, bei Alkalischwerden der Lösung sofort HCl nachgeben, stets kongosauer halten). Nach 2stündigem Erhitzen wird abfiltriert und die Kohle in derselben Weise zum zweitenmal behandelt. Die 20-g-Portion wird ebenso eluiert. Die klaren Filtrate werden mit Bariumchlorid von der Schwefelsäure befreit und im Vakuum auf 50 ccm (60°) eingeengt. Für den Tierversuch werden die Lösungen durch Zusatz von 15 % Aklohol konserviert im Eisschrank aufbewahrt. — Man kann die Kohle noch ein zweites Mal mit einer Lösung von 50 %igem Alkohol unter Zusatz von 1 % HCl behandeln (2mal je 150 ccm). Der Extrakt ist aber weniger wirksam. — Die Ausbeute beträgt aus obiger Hefemenge etwa 1200—2000 kurative TTD. Die Wirksamkeit schwankt zwischen 0,4—1 mg pro die. Die zweite Säureextraktion gibt 1500 TTD mit einer Wirksamkeit von 1—2 mg. Die Alkoholelution liefert 600 TTD derselben Wirksamkeit. Die Lösungen enthalten noch Metalle und Säuren. Man behandelt sie nach Entfernung des Alkohols im Vakuum und Einstellung des

---

53) Kinnersley c. s., Biochemic. J. 21, 777 (1927); 19, 820 (1925); 18, 858 (1924); Nature (Lond.) 1932, 774; J. of Physiol. 76, 17 (1932).

p_H auf 4,5, mit Schwefelwasserstoff filtriert den Niederschlag ab und kocht zur Entfernung des H_2S kurz auf. Nach Einengung im Vakuum kann eine fraktionierte Alkoholfüllung eingeschaltet werden.

b) Darstellung eines B_1-Konzentrats für Fütterungsversuche (Wirksamkeit 0,3—0,5 mg)

Für Testversuche kann man einfacher ein Konzentrat erhalten, wenn man die eben beschriebene Methode bis zur Barytfällung durchführt und das Filtrat vom Barytniederschlag mit Schwefelsäure im Überschuß versetzt. Man stellt auf $p_H = 2,5$ mit Salzsäure ein, filtriert vom Bariumsulfat ab und behandelt die Lösung wie beschrieben mit 60 g Kohle. Die Kohle wird verworfen. Nach Einstellung des Filtrats auf $p_H = 7$ wird erneut an Kohle adsorbiert. Die Kohle wird nun mit n/10 Salzsäure eluiert. Man erhält eine Substanz der Wirksamkeit 0,3—0,5 mg.

c) Darstellung eines B_1-Konzentrats unter gleichzeitiger Darstellung eines B_4-Konzentrats

Die Herstellung eines B_4-haltigen Vitamin B_1-Konzentrats ist für manche Zwecke, bei denen man auf die Zufuhr beider Vitamine angewiesen ist, von Bedeutung. Die im folgenden beschriebene Methode besitzt außerdem den Vorteil, zu sehr reinen B_1-Präparaten zu führen, die durch einige weitere Manipulationen in kristallisierter Form gewonnen werden können. Das nachstehende Beispiel bezieht sich auf eine Hefemenge von 100 kg. Erforderliche Lösungen:

Bleiacetat	22,5 kg
Baryt, kristallisiert	9—10 kg
Natronlauge	1500 kg
Schwefelsäure, konzentriert .	1500—2000 ccm
Kohle (Norit)	2000 g
Salzsäure, konzentriert . . .	350—500 ccm
Alkohol	6—8 Liter

Extraktion der Hefe: Man erhitzt 20 Liter Wasser zum Sieden und trägt 19—20 kg Hefe in kleinen Portionen unter Rühren ein. Nachdem die letzte Portion eingebracht wurde, bringt man die Lösung zum Sieden und zentrifugiert heiß (etwa 15 Minuten lang.) Die Lösung zeigt nach dem Zentrifugieren noch eine Temperatur von 50—60°. Die Extraktion wird mit derselben Hefemenge noch weitere 4 Male wiederholt. Man erhält als Ausbeute eine Gesamtfiltratmenge von 124 bis 127 Liter. Man vereinigt die Filtrate aus den 100 kg Hefe und kühlt sie ab. Die Vitaminausbeute läßt sich durch eine zweite Extraktion nicht wesentlich erhöhen, auch scheint eine Säureextraktion keine großen Vorteile zu bringen.

Bleiessigfällung: Der p_H des erhaltenen Hefeextrakts soll 6,5—6,8 betragen. Das Filtrat wird pro Liter mit 16 ccm einer 25%igen, neutralen Bleiacetatlösung versetzt und 24 Stunden aufbewahrt. Der p_H der Lösung sinkt dabei auf etwa 5—6. Es sind etwa 2000—2500 ccm Bleiacetatlösung für eine vollständige Fällung nötig. Der Niederschlag wird entweder abzentrifugiert oder durch große Faltenfilter filtriert. Die Filtration dauert 24 Stunden. Der Bleiniederschlag kann auf Vitamin B_2 aufgearbeitet werden.

Barytfällung: Das Filtrat der Bleifällung wird mit Baryt behandelt. Man erhitzt in einem 1500 ccm Kolben 2—300 ccm Wasser und soviel festes Baryt, daß die Flasche etwa $^2/_3$ voll ist. In die siedende Lösung trägt man eine solche Menge an festem Baryt ein, daß auf 300 ccm Lösung insgesamt 1200 g kommen. Zu je 32 Liter der obigen Vitaminlösung gibt man 1000—1500 ccm dieser Barytlösung und verrührt 3—5 Minuten bei höchstens 25°. Bei Ausbleiben einer Fällung setzt man 1—2 ccm der Bleiessiglösung zu. Man filtriert schnell ab und fängt das Filtrat

in Schwefelsäure auf. Es muß stets kongosauer bleiben. Man filtriert und stellt die Lösung auf $p_H = 1$ mit Schwefelsäure ein.

Kohleadsorption bei $p_H = 1$: Je 32 Liter des erhaltenen Filtrats werden mit 180 g trockener Kohle (Norit) 20 Minuten gerührt. Die Kohle wird vorher mit konzentrierter Schwefelsäure aufgekocht und mit destilliertem Wasser gewaschen, bis im Filtrat keine Säure nachweisbar ist. Nach der Adsorption wird abfiltriert und mit n/10 Schwefelsäure gewaschen. Es ist darauf zu achten, daß die Kohle während der Filtration nicht auf dem Filter trocknet. Man wäscht die etwa 700 g Kohle aus der ganzen aufgearbeiteten Hefemenge mit ca. 2000 ccm der Säure. Nach dem Waschen wird der Kohlenniederschlag in einem 4-Liter-Becher mit 800 ccm 50 %igem Alkohol (mit Salzsäure bis zum $p_H = 1$ versetzt) zusammen mit dem Filter extrahiert (über Nacht stehen lassen). Das Filtrat enthält B_1 neben B_4.

Kohleadsorption bei $p_H = 7$: Das Filtrat der Kohleadsorption bei $p_H = 1$ wird mit 20 %iger NaOH auf $p_H = 7$ eingestellt und für je 32 Liter mit 320 g Kohle versetzt. Man verbraucht etwa 1000—1200 ccm Natronlauge. Der p_H muß auf $\pm 0{,}04$ genau bestimmt werden. Die Kohle wird 10 Minuten verrührt und dann abfiltriert. Man wäscht sie 3—4mal mit destilliertem Wasser (pro Filter etwa 15 ccm). Die vereinigten Kohlemengen (etwa 1200 g) werden in einem 6-Liter-Kolben mit 2 Liter kalter n/2-Salzsäure verrührt. (Reaktion kongosauer.) Die Extraktion kann über Nacht geschehen.

Elution des Vitamins B_4: Die Kohle von der 1. Adsorption wird, wie beschrieben, mit Säurealkohol auf dem Wasserbad bei 70° behandelt und der Prozeß mit der Kohle 3mal wiederholt. Man engt das Filtrat im Vakuum auf 3 Liter ein. Die Lösung wird mit Natronlauge auf $p_H = 3$ eingestellt und im Eisschrank aufbewahrt. Sie enthält 18000 Tagesdosen Vitamin B_4 und etwa 3000 Tagesdosen B_1.

Elution des Vitamins B_1: Das Kohleadsorbat bei $p_H = 7$ wird in 4 1500-ccm-Bechern mit n/2-Salzsäure extrahiert und 10—15 Minuten bei 80° gehalten. Der Niederschlag wird abgesaugt. Zwei weitere Extraktionen der Kohle mit je 2 Liter n/10-Salzsäure folgen. Der Gesamtextrakt (6 Liter) wird auf $p_H = 3{,}0 \pm 0{,}2$ eingestellt und auf dem Wasserbad auf 1500 ccm eingeengt. Man gibt während des Erhitzens nach und nach 10 %iges Bariumchlorid zu, um freiwerdende Schwefelsäure zu binden. Der Extrakt enthält 24000 Tagesdosen B_1 und nur wenig B_4. Man neutralisiert die Lösung und entfernt einen evtl. entstehenden Niederschlag. Das p_H wird auf 3,5 eingestellt, die Lösung mit Alkohol (bis zu 65 %) versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch wird der Alkohol im Vakuum entfernt.

Zweite Extraktion der Kohle von $p_H = 7$: Die Kohle, aus der das Vitamin B_1 nach vorstehender Methode eluiert wurde, wird 4mal mit je 1400 ccm 50 Vol.-%igem Alkohol, n/10 an Salzsäure 15 Minuten auf dem Wasserbad bei 80° extrahiert. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad eingeengt und auf $p_H = 3$ eingestellt. Die Lösung enthält 10000—12000 Tagesdosen B_1 und etwas B_4.

Entfernung vorhandener Metalle: Etwa vorhandene Metalle können durch Schwefelwasserstoff entfernt werden. Man bringt die Lösungen auf $p_H = 4$, leitet das Gas hindurch und kocht das Filtrat des Sulfidniederschlags kurz auf.

Alle dargestellten Extrakte enthalten neben B_1 auch B_4. Eine vollkommene Trennung kann durch Fällung mit Merkurisulfat erreicht werden. Für Zwecke des Tierversuchs genügt aber der dargestellte Extrakt immer. Man kann sogar meist auf eine Trennung der Vitamine verzichten und eine einmalige Kohleadsorption bei $p_H = 2{,}5$ vornehmen. Die Elution mit 50 %igem angesäuertem Alkohol liefert 40000 B_1-Einheiten neben B_4.

7. Darstellung eines B_1-Konzentrats nach Guha und Drummond 54)

Extraktion: 101,8 kg Weizenembryo werden mit 254,5 Liter 50 Vol.-%igem Alkohol unter Zusatz von 0,5 % konzentrierter Salzsäure zweimal je 3—4 Stunden bei 60—70° extrahiert. Das gelbe Filtrat wird im Vakuum zur Trockne gebracht. Ausbeute: 20,15 kg einer gelben viskösen Masse. Wasserfrei 15,59 kg. Wirksamkeit im Rattenwachstumsversuch 77 mg pro die.

54) Guha c. s., Biochemic. J. 23, 880 (1929).

1. Methode

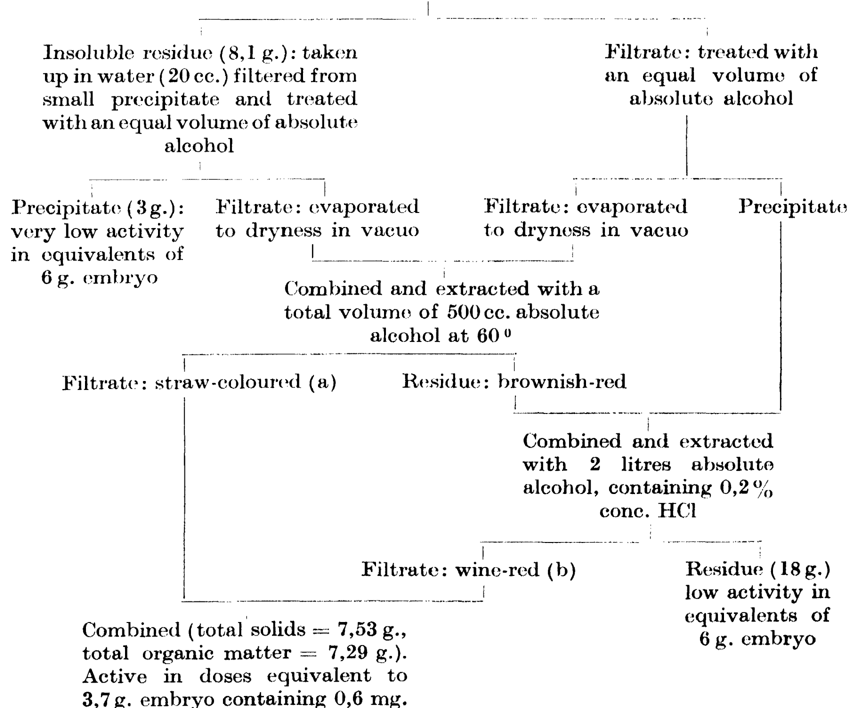
Bleiessigfällung: Die aus 49 kg hergestellte Extraktmenge wird in 22 Liter Wasser gelöst und mit 1,2 kg Bleiacetat in 50 %iger Lösung versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und gewaschen. Das Filtrat (etwa 25 Liter) wird mit Salzsäure (etwa 310 ccm) angesäuert (kongosauer). Ein etwa entstehender Niederschlag wird verworfen. Die Lösung wird mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit. Die erhaltene Trockensubstanz ist wirksam in Mengen von 48—72 mg.

Kohleadsorption: Das Filtrat von a) (etwa 24 Liter) wird zweimal mit je 500 g Kohle (Norit) je 20 Minuten gerührt, nachdem es auf p_H 2,8—3,0 eingestellt war. Die Kohle wird abfiltriert, gewaschen und dann in 5 Liter 50 %igem Alkohol 1 %ig an Salzsäure suspendiert. Man erhitzt 30 Minuten bei 60°. Die Operation wird mit derselben Menge Elutionsflüssigkeit wiederholt. Das Filtrat der ersten Kohleadsorption wird auf $p_H = 4$ eingestellt und wieder mit 1 kg Norit in zwei Portionen behandelt. Das Filtrat dieser Adsorption wird auf $p_H = 5$ gebracht und ebenso aufgearbeitet. Die Kohle wird wie beschrieben eluiert.

Phosphorwolframsäurefällung: Die Extrakte von b) werden auf $p_H = 5$ eingestellt, ein etwa entstehender Niederschlag verworfen. Man gibt Schwefelsäure zu, bis die Lösung 5 %ig ist und versetzt mit 1,5 kg Phosphorwolframsäure (gesättigte Lösung in 5 %iger Schwefelsäure). Das Gemisch bleibt 40 Stunden stehen (Eisschrank). Der Niederschlag, der die wirksame Substanz enthält, wird abfiltriert und mit konzentrierter Salzsäure zerlegt. Die Phosphorwolframsäure wird durch Extraktion mit Amylalkohol und Äther entfernt.

Tabelle 73

Dry residue (total wt. = 29,2 g. equiv. to 45 kg. embryo). Taken up in 50 % alcohol (250 cc.) at 60°



Adsorption an Silberoxyd: Die Lösung von c) wird mit einer frisch bereiteten Lösung von Silberoxyd bis zur schwach alkalischen Reaktion (gegen Lackmus) versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, gewaschen und 2mal mit 50%igem Alkohol unter Zusatz von Salzsäure (etwa 1% mehr als zur Bindung des Ag erforderlich ist) extrahiert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt. Es ist wirksam in Mengen von 1,3 mg pro die.

Alkoholfraktionierung: Eine Fraktionierung mit Alkohol, die aus vorstehender Tabelle 73 hervorgeht, reinigt den Extrakt weiter. Die Lösung d) wird dann zur Trockne verdampft und nach dem Schema behandelt.

2. Methode

Fullererdeadsorption: 2 kg des Extrakts (trocken) entsprechend 10 kg Weizenembryo, werden in 20 Liter destilliertem Wasser gelöst, mit 1 kg Fullererde geschüttelt und nach 12 Stunden filtriert. Die Fullererde wird mit Wasser vom p_H = 4—5 gewaschen und mit Baryt in kleinen Portionen fein gemahlen. Das Filtrat wird in Schwefelsäure aufgefangen, vom Bariumsulfat befreit und im Vakuum auf 750 ccm eingeengt. Wirksamkeit: 2,9 mg pro Tag.

Trennung mit Silbernitrat und Baryt: Die Lösung a) wird auf p_H = 1,8 eingestellt und mit 45 ccm einer 50%igen Silbernitratlösung versetzt (im Überschuß). Ein Tropfen der Lösung muß nach Zusatz von Baryt braun werden. Die Lösung wird mit Baryt auf p_H = 4,5 gebracht und der ausfallende Niederschlag abfiltriert. Dann gibt man zum Filtrat Barytlösung bis p_H = 6,5 hinzu und bewahrt die Lösung über Nacht im Eisschrank auf. Der dunkelbraune Niederschlag wird abfiltriert und mit Salzsäure zerlegt. Die Fraktion p_H = 6,5 ist wirksam in Dosen von 0,21 mg pro die.

Phosphorwolframsäurefällung: Der Extrakt b) wird mit Schwefelsäure versetzt (5%) und mit Phosphorwolframsäure in 5%iger Schwefelsäure gefällt (30 Stunden, Eisschrank). Man filtriert den Niederschlag ab, wäscht und verreibt ihn in 75 ccm 50%igem Aceton. Das Filtrat wird mit 300 ccm 5%iger Schwefelsäure versetzt und 40 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Der dabei ausfallende Niederschlag wird mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und in 60 ccm 50%igem Aceton gelöst. Die Lösung wird mit 70 ccm ges. Baryt versetzt und schnell filtriert. Das Filtrat wird in Schwefelsäure aufgefangen und mit Baryt genau neutralisiert. Wirksamkeit bei der Ratte 0,1 mg, bei der Taube 0,014 mg pro die.

Platinchloridfällung. Die Lösung c) wird zur Trockne gebracht (höchstens 40°). Der Rückstand wiegt 0,2677 g. Man löst ihn bei 60° in 250 ccm absolutem Alkohol und entfernt den unwirksamen Niederschlag. Die eingeengte Lösung wird mit 5%igem Platinchlorid in absolutem Alkohol gefällt und nach 40 Stunden (Eisschrank) filtriert. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man erhält eine farblose Lösung mit 24,9 mg Substanz, die in Tagesdosen von 0,105 mg bei der Ratte und 0,00515 mg bei der Taube wirksam ist.

Die wirksame Substanz kann durch eine Goldchloridfällung in absolutem Alkohol in kristallisierter Form gewonnen werden.

VIII. Darstellung verschiedener Rohextrakte für den Tierversuch

1. Tikitiki nach Wells[55]): Man extrahiert Reisschalen mit 25%igem Alkohol und engt das Filtrat zur Sirupkonsistenz ein. Das B_1-Konzentrat genügt in Dosen von 0,03—0,04 ccm pro die, um den Bedarf zu decken.

2 Gew.-Teile Reisschalen werden mit 4 Teilen 25 Gew.-%igem Alkohol 48 Stunden lang extrahiert. Man dekantiert und preßt die Masse aus. Die Lösung wird filtriert. Man engt bei maximal 70° im Vakuum (10 mm) ein, bis das spezifische Gewicht der Lösung bei 70° etwa 1,18 beträgt. Die Lösung wird abgekühlt und nach

55) Wells, Philippine J. Sci. 19, 67 (1921).

dem Absitzen des Niederschlags dekantiert und zentrifugiert. Der klare Sirup wird mit $^1/_3$ seines Volumens an 95%igem Alkohol versetzt, der Niederschlag entfernt und das Filtrat im Vakuum auf das spezifische Gewicht 1,32 gebracht. Nach Abkühlung der Lösung wird zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wird an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten bei 62,5° erhitzt und gut verschlossen aufbewahrt. Völlig B_2-frei erhält man den Extrakt durch Fällung mit dem 12fachen Volumen 95%igem Alkohol und Entfernung des Niederschlages.

Die Ausbeute beträgt aus 2 kg Schalen etwa 100 ccm. Es ist unbedingt erforderlich, mit frischen Reisschalen zu arbeiten, die man vom Government of the Philippine Islands Department of Agriculture and Naturel Resources, Manila P. I., beziehen kann.

2. **Weizenextrakt von Bourquin:** s. Vitamin B_2-arme Kostmischungen.

3. **Fullererdeadsorbat:** s. Vitamin B_1-Standard.

4. **Methode von Stuart-Block-Cowgill 55a):**

3 kg Reisschalen, enthaltend etwa 6000 TTD B_1, werden mit 30 Liter mit Chloroform gesättigtem Wasser extrahiert. Der Extrakt wird mit Salzsäure auf p_H = 4,5 eingestellt und mit 50 Lloyds Reagens versetzt. Man rührt im Laufe eines Tages mehrmals um, läßt absitzen und hebert die überstehende Lösung ab. Der Niederschlag wird zentrifugiert und mit verdünnter Essigsäure gewaschen bis das Waschwasser farblos bleibt. Der Niederschlag wird mit 200 ccm Elutionslösung 30 Minuten lang gerührt (bei etwa 50—60°). Die Elutionslösung besteht aus 350 ccm Wasser, 60 ccm konzentrierter Salzsäure und 120 ccm 95%igem Alkohol. Man filtriert und erhält im Filtrat etwa 4000 TTD. Wirksamkeit etwa 4 mg pro TTD.

IX. Reindarstellung und chemische Natur des Vitamins B_1

Nach zahlreichen Versuchen, das antineuritische Vitamin zu isolieren, gelang es 1931 Windaus, Tschesche, Ruhkopf, Laquer und Schultz 56) kristallisierte Präparate herzustellen, die schon in Dosen von ca. 2,4 γ wirksam sind. Nach den beschriebenen Methoden von Seidell, Janssen usw. wird das Vitamin zunächst an Fullererde adsorbiert und das eluierte Vitamin mit Hilfe von Merkurisulfat, Silbernitrat und durch Benzoylierung gereinigt. Man fällt die Lösung des Vitamins mit Goldchlorid, zerlegt das kristallisierte Goldsalz und fällt das gut kristallisierende Pikrolonat. Schließlich wird daraus das salzsaure Salz gewonnen. Das Vitamin B_1 ist eine Substanz der Zusammensetzung $C_{12}H_{16}N_4OS$.

Die chemische Natur der Verbindung ist unbekannt. Fast gleichzeitig mit der deutschen Forschergruppe wurde von van Veen 57) und ebenso von Ohdahke 58) aus Reisschalen eine Substanz isoliert, die in ihren chemischen Eigenschaften und biologischer Wirksamkeit mit dem Vitamin B_1 übereinstimmt, wenn auch die Analysen teilweise abweichen. Man nimmt neuerdings an, daß das isolierte Reisvitamin das Hydrat des Hefevitamins ist. Die Mitteilung von Guha 59), daß Adeninsulfat durch UV.-Bestrahlung in Vitamin B_1 übergeht, konnte widerlegt werden.

55a) Stuart-Block-Cowgill, J. of biol. Chem. 105, 465 (1934).
56) Windaus-Tschesche c. s., Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 13, 207 (1931); 22, 342, 343 (1932); Z. physiol. Chem. 204, 125 (1932).
57) van Veen, Geneesk. Tijdschr. Nederl.-Indië 72, 1397, 1146 (1932); Z. physiol. Chem. 208, 125 (1932); Rec. Trav. chim. Pays-Bas et Belg. (Amsterd.) 51, 265, 279 (1932).
58) Ohdahke, Proc. imp. Acad. Tokyo 8, 179 (1932).
59) Guha, Nature (Lond.) 1932, 741.

In letzter Zeit wurden wiederholt Methoden beschrieben, die eine Reindarstellung des Vitamins B_1 ohne große Schwierigkeit ermöglichen. Genannt seien nur die Verfahren von Kinnersley und Mitarbeiter 60), Janssen und Mitarbeiter 61), Seidell und Smith 62).

Darstellung des Vitamins B_1 nach Kinnersley, O'Brien und Reader

Die Autoren beschrieben neuerdings ein Verfahren zur Gewinnung von 500 mg Vitamin B_1 aus 2000 kg Hefe. Die ersten Reinigungsprozesse wurden bereits oben beschrieben.

Danach werden die Extrakte, die man aus der Kohleadsorption bei $p_H = 7$ gewinnt (mit n/2 und n/10 Salzsäure), auf 1500 ccm eingeengt (Extrakt aus 50,5 kg Hefe) und mit Natronlauge auf $p_H = 2$ gebracht. Man engt weiter auf dem Wasserbad auf 750 ccm ein. Man stellt mit 20%iger Natronlauge den $p_H = 5$ her und entfernt einen evtl. ausfallenden Niederschlag. Filtrat und evtl. Waschwasser des Niederschlags werden mit 250 ccm 10%iger reinster Phosphorwolframsäure (vorher mit Natronlauge auf $p_H = 5$ eingestellt) gefällt. Die Lösung wird mit Schwefelsäure + Phosphorwolframsäure auf $p_H = 1$—2 gebracht und über Nacht kühl aufbewahrt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird mit Baryt fein gepulvert und mit Wasser ausgelaugt. Das Filtrat wird in Schwefelsäure aufgefangen. Man extrahiert das Gemisch aus Niederschlag und Baryt mindestens 6mal, bis der Extrakt farblos ist. Der vom Baryt durch Schwefelsäure befreite Extrakt (etwa 250 ccm) wird im Vakuum eingeengt. Dabei wird 10%iges Bariumchlorid zugesetzt (etwa 25 ccm). Das p_H der Lösung soll 3 betragen. Man engt auf 1—2 ccm ein. Man behandelt die Lösung mit 100 ccm absolutem Alkohol und kühlt auf 0° ab. Der unwirksame Niederschlag wird verworfen. Der alkoholische Extrakt wird im Vakuum nach Zugabe von 10 ccm Wasser auf 100 ccm eingeengt. Man versetzt mit 5 n NaOH bis $p_H = 7$ (nicht alkalischer!) und fällt erneut mit 10 ccm 10%iger Natrium-1 : 24-Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag wird wie oben mit Baryt zerlegt. Das Filtrat wird, nachdem es auf $p_H = 7$ eingestellt wurde, wieder mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die vereinigten Filtrate der Phosphorwolframsäureniederschläge bei $p_H = 7$, deren Volumen 200—250 ccm beträgt, werden nun mit etwa 20 ccm n/10-Schwefelsäure auf $p_H = 4$ gebracht, wobei ein Niederschlag entsteht. Wenn nötig, muß mehr Phosphorwolframsäure zugegeben werden. Der ausfallende Niederschlag enthält die wirksame Substanz. Er wird abfiltriert und mit Baryt zerlegt. Man fängt die Lösung in verdünnter Schwefelsäure auf, stellt mit Baryt p_H auf 3 ein und engt auf dem Wasserbad unter Zugabe von Bariumchlorid ein. Die letzten Reste der Flüssigkeit werden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol (100 ccm) aufgenommen und die Lösung 7 Stunden lang kühl aufbewahrt. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Alkohol befreit und mit 15 ccm Wasser versetzt. (Temperatur nie über 40°.) Ein entstehender Niederschlag wird verworfen. Nach Einstellen des p_H auf $3 \pm 0,2$ fällt man mit 2,5 ccm einer 10%igen Goldchloridlösung in Wasser und kühlt 1 Stunde im Eisschrank. Der Niederschlag wird darauf abzentrifugiert, in 15 ccm n/200 Salzsäure suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt (etwa 1—2 Stunden). Das Filtrat wird mittels Durchleiten von Stickstoff vom Schwefelwasserstoff befreit. Man versetzt das Filtrat mit 5 ccm n/10 Baryt, einigen Tropfen 10%iger Bariumchloridlösung ($p_H = 3,5$) und engt im Vakuum auf 0,3—0,5 ccm ein. Der Rest wird mit 5 ccm absolutem Alkohol aufgenommen, filtriert und der Filterrückstand mit 3 Tropfen Wasser und 2 ccm absolutem Alkohol gewaschen. Das Filtrat engt man im Vakuum auf 1—2 ccm ein. Dabei entstehende Niederschläge werden verworfen. Durch Zugabe von absolutem Alkohol wird der größte Teil des Wassers entfernt. Nach Entfernung der letzten Spuren Bariumchlorid erscheinen die Kristalle des Vitamins

---

60) Kinnersley c. s., Biochemic. J. 27, 232 (1933).
61) Janssen c. s., Rec. Trav. chim. Pays-Bas et Belg. (Amsterd.) 52, 366 (1933).
62) Seidell c. s., J. amer. chem. Assoc. 55, 3380 (1933).

aus einer 98 %igen warmen alkoholischen Lösung innerhalb 1 Stunde. Es ist nicht immer leicht, eine scharfe Grenze zwischen Entfernung des Bariumchlorids und Beginn der Kristallisation zu treffen. Ausbeute an krist. Substanz 15—20 mg. Wirksamkeit etwa 2,3 γ. Die Substanz wird aus wenig Wasser bei $p_H = 3$ (Salzsäure) umkristallisiert.

Für den Tierversuch bewahrt man die Lösungen in der Kälte auf, am besten in absolutem Alkohol nach Zusatz von 0,1 % konzentrierter Salzsäure oder in n/1000 Salzsäure unter Zugabe von 20 Vol.-% Alkohol.

X. Eigenschaften des Vitamins B_1

Tabelle 74

Wirksamkeit des reinen Vitamins	1,4—3,3 γ als Taubentagesdosis
Löslichkeit	Löslich in Wasser, verdünnten Säuren, Alkohol; unlöslich in Äther, Chloroform
Temperaturbeständigkeit	Bei 120° zerstört. Nach 5stündigem Autoklavieren wirkungslos, in saurer Lösung stabiler, in alkalischer Lösung sehr schnell zerstört. Bei Anwesenheit von Wasser leichter zerstört als in trocknen Substanzen
Oxydationsempfindlichkeit	Unempfindlich; H_2O_2, Ozon und Permanganat zerstören nicht
Lufttrocknung	Zerstört nicht
Fällbarkeit	Fällbar durch: Silbernitrat in alkalischer Lösung, ebenso durch Sublimat; fällbar durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid, wäßriger Pikrolonsäure und Goldchloridchlorwasserstoffsäure in alkoholischer Lösung, durch letztere nur teilweise. Reines Vitamin durch Pikrinsäure nicht fällbar. — Nicht fällbar durch bas. Bleiacetat, Silbernitrat oder Merkurisulfat in saurer Lösung
Adsorbierbarkeit	Adsorbiert durch Fullererde, Kohle, Kaolin, kolloidal. Aluminiumhydroxyd und Eisenhydroxyd, kolloidal. Arsentrisulfid, Silicagel. Adsorption abhängig vom p_H
Alkaliempfindlichkeit	Alkali zerstört schon bei Zimmertemperatur
Dialysierbarkeit	Dialysiert durch Membranen, die für Methylenblau durchgängig sind
Besondere Eigenschaften	Durch Benzoylchlorid und Soda in der Kälte nicht verändert, aber von Verunreinigungen befreit
Salze	Goldsalz unbeständig, salzsaures Salz Schmelzpunkt 245 u. Z., Pikrolonat in 2 Modifikationen

Tabelle 75. Zusammenstellung der Wirksamkeit verschiedener Vitamin B_1-Präparate im Taubentest (nach Windaus)

B. C. P. Jansen, H. W. Kinnersley, R. A. Peters und V. Reader	7— 9 γ
B. C. Guha	12—24 γ
H. W. Kinnersley und R. A. Peters	12 γ
R. R. Williams, R. E. Watermann und S. Gurin	40 γ
S. Ohdake	20—50 γ
Windaus c. s.	1,4—3,3 γ

Das Vitamin B_2 1), 2), 3)

I. Die komplexe Natur des Vitamins B_2

Die Notwendigkeit, neben dem antineuritischen Vitamin B_1 einen zweiten Faktor annehmen zu müssen, ergab sich aus den Untersuchungen von Seidell, Salmon c. s., Hauge c. s., Scotti-Foglieni und namentlich Goldberger. Sie konnten nachweisen, daß in Hefe und anderen Nahrungsmitteln neben dem antineuritischen Vitamin, das leicht adsorbierbar und hitzelabil ist, eine zweite außerordentlich hitzestabile Substanz vorhanden war. Dieses Vitamin, das Goldberger mit der Enstehung der Pellagra in Zusammenhang brachte, wurde bis vor kurzem Vitamin B_2 oder G genannt. Heute wissen wir, daß dieser Faktor nicht einheitlich ist, sondern einen Komplex aus drei verschiedenen selbständigen Vitaminen darstellt. Der B_2-Komplex besteht aus:

1. Wachstumsfaktor, dem eigentlichen Vitamin B_2 (von Kuhn, György c. s. isoliert und als Flavin identifiziert).
2. Antidermatitisfaktor oder Antipellagravitamin, das von György neuerdings die Bezeichnung B_6 erhält.
3. Antianämischem Faktor oder Anti-Sprue-Vitamin (?), nach Castle: extrinsic factor.

Im folgenden werden die einzelnen Vitamine unter diesen Bezeichnungen abgehandelt.

II. Die Erscheinungen des Vitamin B_2-Mangels

Eine reine Avitaminose B_2 ist beim Menschen unbekannt. Auch die Erscheinungen des B_2-Mangels beim Tier sind meist auf das Fehlen des gesamten B_2-Komplexes zurückzuführen. Das einzig sichere, auf B_2-Mangel beruhende Symptom ist der Wachstumsstillstand, der bei Ratten, Mäusen und Kücken nach Verfütterung eines B_2-freien Futters in einigen Wochen eintritt und spezifisch durch Flavinzugabe verhütet oder geheilt werden kann. Die auf B_2-freien Kostmischungen manchmal zur Beobachtung kommenden Hautveränderungen und Blutanomalien beruhen auf Mangel an B_6 (oder extrinsic factor) und sind dementsprechend auch durch das Vitamin B_2 nicht zu beeinflussen.

Wachstumsstillstand neben Pellagraerscheinungen tritt bei Kücken auf, wenn sie mit der oben beschriebenen beriberierzeugenden Diät, die 6 Tage lang trocken erhitzt wurde (95—100^0), ernährt werden. Die Tiere nehmen von Anfang an nur wenig an Gewicht zu. Pellagra entwickelt sich in 6 Wochen (s. Antipellagravitamin). Die Zugabe von 6% autoklavierter Hefe oder 8% Magermilchpulver oder 4% Leberextrakt zur Kost ermöglicht normales Wachstum.

Ob die Entstehung von Katarakt, die neuerdings bei Ratten und Mäusen auf B_2 freien Kostformen beschrieben wird, mit dem Flavinmangel zusammenhängt oder mit dem Fehlen eines anderen Bestandteiles des B_2-Komplexes, ist nicht zu beantworten **3a)**.

---

1) Sherman c. s., Vitamins 1931.
2) Browning, Vitamins. London 1931.
3) Stepp, Pellagra.
3a) Day c. s., J. Nutrit. 97 (1934).

III. Die biologischen Methoden zur Auswertung des Vitamins B_2

A. Versuchstiere und deren Haltung

Als Versuchstiere dienen 20—30 Tage alte Ratten im Gewicht von 45—50 g oder auch solche mit einem Gewicht von etwa 35 g. Sie entstammen am besten einer Zucht, die mit $^2/_3$ Weizen und $^1/_3$ Vollmilchpulver unter Zusatz von 5 g Fleisch pro Tag und Tier ernährt wurde. Die Versuchstiere werden in Einzelkäfigen gehalten und mit einer B_2-freien Kostmischung und Wasser ad lib. gefüttert. Kuhn, György und Mitarbeiter nehmen 4—6 Wochen alte, 25—35 g schwere Tiere, die auf der Grunddiät schon nach 1—3 Wochen Gewichtsstillstand zeigen.

Bei den Versuchstieren ist eine pellagraähnliche Hauterkrankung selten. Wenn Veränderungen erscheinen, sind sie gewöhnlich nicht sehr ausgeprägt und bestehen in Rötung und Schuppung der Pfoten, besonders an den distalen Enden, schuppigem Schwanz und mäßigem Haarausfall auf dem Rücken. Meist sind es Erscheinungen, die für die klassische Pellagra nicht typisch sind, sondern die wahrscheinlich auf den dauernden Flavinmangel zurückgeführt werden müssen. In gewissem Sinne ist also auch das B_2 ein Hautfaktor (György). Dagegen sind die für B_6 spezifischen Symptome auf manchen Kostformen überhaupt nicht zu sehen. Sie entstehen nur, wenn in der Diät das Vitamin B_2 in genügenden Mengen vorhanden ist bei gleichzeitigem Mangel an Vitamin B_6.

B. Vitamin B_2-freie Kostmischungen

Bei der Herstellung einer flavinfreien Kost sind verschiedene Punkte zu berücksichtigen, die für das Gelingen eines Versuchs ausschlaggebend sind.

1. Die benutzten Kostbestandteile sind nicht ohne weiteres brauchbar, da sie, wie z. B. Casein, manchmal erhebliche Vitamin B_2-Mengen enthalten können. Casein muß vor der Verwendung gereinigt werden. Am besten ist die Darstellung des Caseins aus Magermilch durch Fällung mit Essigsäure und Umfällen aus Natronlauge. Das Casein muß darauf mit Essigsäure gewaschen werden (mindestens 1 Woche, Lösung täglich erneuern). Das getrocknete Casein wird mit Alkohol erschöpfend extrahiert. Auch die langdauernde Extraktion mit Essigsäure und eine nachfolgende Behandlung mit 60%igem angesäuertem Alkohol, mit einer Erhitzung des trockenen Präparats in flachen Schalen an der Luft (3 Tage auf 120°) ist geeignet. Nach Sherman-Spohn verrührt man 200 g Casein mit 1 Liter 60 Gew.-%igem Alkohol ½ Stunde, läßt 5½ Stunden stehen, saugt ab und wäscht mit 500 ccm desselben Alkohols nach. Das Casein wird darauf nochmals mit 1 Liter 60%igem Alkohol ½ Stunde lang behandelt und 18 Stunden aufbewahrt. Man wäscht mit 500 ccm 60%igem Alkohol, dann mit 500 ccm 90%igem Alkohol und trocknet an der Luft.

2. Eine B_2-freie Kost muß alle anderen für die Ratte nötigen Vitamine, wie A, D und namentlich die B-Vitamine enthalten. Die Vitamine A und D werden mit Lebertran zugeführt. Die Verfütterung einer genügenden Menge B_1 kann auf verschiedene Weise erfolgen:

a) Durch Injektion eines B_1-Konzentrats z. B. nach Kinnersley, wobei man pro Tag und Tier eine etwa 0,6 g Hefe entsprechende Menge verabreicht.
b) Durch Verfütterung eines B_1-Extrakts, wie Tikitiki.
c) Durch Verfütterung eines Vitamin B_1-Fullererdeadsorbats 4).
d) Durch Imprägnierung der Stärke mit einem B_1-haltigen Weizenextrakt 5).
e) Durch Zugabe von 30% Weizen zur Kostmischung, wodurch der B_2-Gehalt nur unwesentlich erhöht wird 6).

Sämtliche Methoden der Darreichung des Vitamins B_1 sind gleichwertig. Am bequemsten ist fraglos die Imprägnierung der Stärke mit dem B_1-Extrakt aus Weizen. Der Extrakt wird wie folgt hergestellt:

800 g Weizen werden frisch gemahlen, mit 1,5 Liter 80%igem Alkohol 1½ Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt und filtriert. Der Rückstand wird in derselben Weise mit 1 Liter Alkohol nachbehandelt und 1 Stunde geschüttelt. Der Weizen wird abfiltriert und mit 300 ccm Alkohol gewaschen. Nach Vereinigung der alkoholischen Extrakte engt man im Vakuum auf ein Viertel ein und gießt die Lösung auf 300 g Stärke, die man danach an der Luft trocknet. Diese imprägnierte Stärke wird dann der Kostmischung zugegeben. Bei der Herstellung des Extrakts ist zu berücksichtigen, daß Weizen etwa 10% Wasser enthält, das bei der Verdünnung des Alkohols mitgerechnet wird. Die Destillationstemperatur muß etwa 28—32° betragen. Die Stärke ist in der Kostmischung in einer solchen Menge enthalten, daß 1 kg Futter den Extrakt aus 500 g Weizen enthält.

Neben dem Weizenextrakt kann auch ein Reisextrakt Verwendung finden. Man stellt ihn her, indem man 1 kg Reisschalen mit 3 Liter kochendem Wasser unter Zugabe von 6 ccm konzentrierter Salzsäure 6 Minuten lang extrahiert. Die Schalen werden abfiltriert, das Filtrat mit 100 ccm einer gesättigten Lösung von neutralem Bleiacetat gefällt und 12 Stunden kühl aufbewahrt. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt und im Vakuum eingeengt.

3. Neben der Vitamin B_1-Zufuhr ist besonders auf die genügende Zufuhr des Vitamins B_4 zu achten 7). Kostmischungen, in denen das Vitamin fehlt, sind für die Auswertung des B_2 ungeeignet, da bei Wachstumsstillstand auf B_2-Zulage überhaupt keine Reaktion erfolgt. Für Wachstum sind alle Vitamine B_2, B_1 und B_4 erforderlich. Das Wachstum wird dabei von dem in der kleinsten Konzentration vorliegenden Vitamin begrenzt. Laktoflavin ist auch in hohen Dosen auf einer B_4-freien Grundkost unwirksam. Das Vitamin B_4 kann zugeführt werden mit Hefekochsäften, aus denen man durch Adsorption in saurer Lösung die Flavine entfernt hat, die für sich allein vollkommen unwirksam sind. Man kann die Kochsäfte ersetzen durch B_4-Lösungen, die man nach Kinnersley, O'Brien, Peters und Reader aus Hefe darstellt (es ist dabei zweckmäßig, abweichend von der Vorschrift nicht mit heißer Barytlösung zu arbeiten, sondern mit kalter (Wagner-Jauregg). Man benötigt für die B_4-Zulage eine Extraktmenge, die 5—15 g frischer Bäckerhefe

4) Salmon-Guerrant-Hays, J. of biol. Chem. 80, 91 (1928).
5) Bourquin, Diss. Columbia University 1929. — Sherman-Sandels, J. Nutrit. 3, 395 (1931); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 26, 536 (1929).
6) Munsell, Home Econom. 1930; J Nutrit. 4, 203 (1931).
7) György e. s., Z. physiol. Chem. 223, 236 (1934).

entspricht. Das Vitamin B_4 kann weiter mit Malzextrakten zugeführt werden, die allerdings reichlich B_2-haltig sind. Das Vitamin B_2 wird daraus durch Adsorption an Frankonit KL in saurer Lösung entfernt.

Die einzelnen Kostformen für die Ratte

Nr. 1 Sherman-Bourquin 8).

Die gebräuchlichste Kostform für den Vitamin B_2-Versuch ist heute die Modifikation der Sherman-Spohn-Dät von Sherman und Bourquin. Die Kost besteht aus:

Casein, gereinigt	18 %
Stärke	68 %
Butterfett	9 %
Salzmischung	4 %
Lebertran	1 %

Die Stärke wird mit dem Bourquin-Weizenextrakt (Vitamin B_1) derart imprägniert, daß 100 g der Mischung den Extrakt aus 50 g Weizen enthalten. Die Kost ist nicht absolut B_2-frei.

Weitere Kostformen für den B_2-Versuch 15), 16), 17, 18)

Nr.	Autor	Stärke	Casein	Fett	Salzgemisch	Tran	
2	Chick c. s. 9) .	60 R	20	15 Ba	5	0,05—0,1 g p. d.	
3	Hunt c. s. 10)	41 25 W	18	10 Ba	4	2	
4	Guerrant 11)	69,3	18	5 B	3,7	2	2 Agar
5	Mc Cosh 12) .	76 D	18		4	5 Tr. T/T	2 Agar
8	Evans 13) . .	72,2 Z	24		3,8	3 Tr. T/T	
7	Guha 14) . .	75	21		4	2 Tr. T/T	
8	Leader 19) .	40 R 17 Z	23	15 P	5	2 Tr. T/T	
9	Akroyd 20) .	1,5 R 65 Mehl	13,5	15 Ba	5		
10	Block 21) . .	48,9 Z	22 0,1 Cystin	24,9 Ba 0,1 Linolsäure	4		

Zeichenerklärung: R = Reisstärke, W = Weizenschrot, D = Dextrin, Z = Zucker, Ba = gehärtetes Baumwollsamenöl = Crisco, P = Palmkernöl, B = Butter.

8) Bourquin-Sherman, J. amer. chem. Soc. 53, 3501 (1931).
9) Chick-Roscoe, Biochemic. J. 22, 790 (1928); 24, 105 (1930).
10) Hunt c. s., J. of biol. Chem. 1928.
11) Guerrant c. s., J. of biol. Chem. 89, 199 (1930).
12) McCosh c. s., J. of biol. Chem. 90, 1 (1931).
13) Evans c. s., J. of biol. Chem. 77, 231 (1928).
14) Guha c. s., Indian. J. med. Res. 21, 211 (1933).
15) Smith, J. of biol. Chem. 100, 225 (1933).
16) Munsell, J. Nutrit. 4, 203 (1931).
17) Williams c. s., J. of biol. Chem. 83, 321 (1929).
18) Narayanan c. s., Biochemic. J. 24, 19 (1930).
19) Leader, Biochemic. J. 24, 1172 (1930).
20) Akroyd, Biochemic. J. 24, 1479 (1930). — Akroyd-Roscoe, Biochemic. J. 23, 483, (1929).
21) Block-Farquhar, J. of biol. Chem. 103, 645 (1933).

Bemerkungen zu vorstehender Tabelle: Zu Nr. 2: Die Kostmischung wird 3 Stunden auf 100° erhitzt. Die B_1-Zugabe erfolgt wie oben. Die Diät ist unter der Bezeichnung P2L bekannt. Zu Nr. 3: Der Weizen wird ganz geschrotet und mit den anderen Bestandteilen gemischt. Die Weizenzugabe soll die B_1-Zufuhr sicherstellen. Zu Nr. 4: B_1 wird als Fullererdeadsorbat verabreicht. Zu Nr. 5: Außerdem erhalten die Tiere pro die 2 Tropfen Weizenkeimöl. Zu Nr. 6: Die Diät wird durch B_1-Zulage ergänzt. Zugabe von täglich 0,7 g Hefe ermöglicht normales Wachstum. Zu Nr. 7: Die Ratten erhalten pro die einen B_1-Extrakt, der 2,5 g Reisschalen entspricht. Zu Nr. 9: Die Diät ist für die Prüfung solcher Substanzen wichtig, die nur sehr wenig B_2 enthalten. Man kann sie in größeren Mengen verabreichen und darf dabei vor allem nicht die Relation der Kost an Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten verändern. Das Verhältnis beträgt bei der Kost P2L Fett : Eiweiß : Kohlenhydrat = 15 : 20 : 60. Bei der Prüfung von white flour z. B., das 10% Eiweiß und 90% Kohlenhydrate enthält, ergibt sich die oben angegebene Kostmischung. Zu Nr. 10: Die Kost ist eine besonders hoch gereinigte. Die Vitamine werden einzeln verfüttert. Vitamin E wird aus dem Unverseifbaren des Weizenkeimöls gewonnen und in Dosen von 35 mg pro die verabreicht. A und D werden als Unverseifbares des Lebertrans in Dosen von 20 mg pro die verfüttert. B_1 wird aus einem Hefeextrakt adsorbiert, eluiert und in Dosen von 10 mg pro die gegeben. Das Casein wird einer besonderen Reinigung unterworfen. Es wird aus Magermilch durch verdünnte Salzsäure gefällt, in Natronlauge gelöst und umgefällt. Darauf wird mit Alkohol extrahiert, getrocknet und 2 Tage bei 90° erhitzt.

C. Die einzelnen Methoden

1. Der kurative Wachstumstest

Der kurative Wachstumstest beruht auf der Erscheinung, daß B_2-frei ernährte junge Ratten nach kurzer Zeit das Wachstum einstellen. Zufuhr des Vitamins B_2 (Flavin) führt spezifisch zu erneuter Gewichtszunahme.

Vorperiode: Während der Vorperiode werden die Tiere entweder wurfweise oder einzeln in Käfigen gehalten, die eine Koprophagie ausschließen. Bei der Einzelhaltung werden sie in gleichwertige Gruppen geteilt (hinsichtlich Abstammung, Gewicht, Geschlecht usw.), bei Gruppenhaltung erfolgt die Aufteilung erst am Ende der Vorperiode. Die Ratten werden während des Versuchs zweimal wöchentlich gewogen. Sie erhalten eine B_2-freie Kost und Wasser ad lib. Nach etwa 10—18 Tagen tritt Gewichtsstillstand ein. Dann beginnt man mit der Zufütterung der zu prüfenden Substanz. Smith (l. c. 15) fängt damit am 10. Versuchstage an. Guerrant-Salmon (l. c. 4) nehmen eine Vorperiode von 2 Wochen. Sherman und Bourquin (l. c. 12) beginnen mit der Auswertung, wenn die Tiere nicht mehr an Gewicht zunehmen oder schon abnehmen. Chick und Roscoe (l. c. 8) füttern erst eine Vitamin B_1-freie Kost und setzen die Ratten dann nach 7—10 Tagen in Einzelkäfige, wo sie eine Zulage von B_1 erhalten. Die Vorperiode dauert 3—4 Wochen. Salmon-Guerrant-Hays (l. c. 4) geben als B_1-Quelle ein Fullererdeadsorbat. Bocher wertet erst nach 8wöchentlicher Versuchsdauer aus. Es ist im allgemeinen besser, die Vorperiode zu beschränken und den Versuch zu beginnen, wenn die Tiere bei mehreren aufeinanderfolgenden Wägungen keine Gewichtszunahme zeigen.

Versuchsperiode: Die Versuchsperiode nimmt ihren Anfang mit der Zufütterung der zu prüfenden Substanz. Für jede Dosis sind 4—6 Tiere anzusetzen. Gruppeneinteilung wie üblich. Die Substanzen sind den Tieren getrennt von der Nahrung zu verabreichen. Für jede auszuwertende Substanz

muß ein Kontrollversuch, der eine Zulage eines bekannten Standardpräparates erhält, und ein negativer Kontrollversuch mitlaufen.

Die Länge der Versuchsperiode variiert bei den einzelnen Methoden stark, was bei einem Vergleich der Auswertungen zu berücksichtigen ist.

Auswertung: Man kann die im Gewichtstest gefundenen Werte auf die Wirkung eines Standards beziehen oder nach absolutem Maßstab vergleichen. Dann wird als B_2-Einheit eine täglich verabreichte Menge festgelegt, die imstande ist, in einer bestimmten Zeit einen gewissen Gewichtsanstieg hervorzurufen.

Nach Chick-Roscoe (l. c. 8) ist die Einheit diejenige Menge, die täglich verabreicht, in 2—4 Wochen einen wöchentlichen Gewichtsanstieg von 10—12 g verursacht. Sie benutzen eine Ratte für mehrere Versuche und ernähren das Tier nach der ersten Auswertung wieder mit der Grundkost, bei Gewichtsstillstand folgt die Auswertung des zweiten Präparates. Akroyd-Roscoe (l. c. 20) verwerfen das Gewicht der 1. Versuchswoche, da die Tiere nur unregelmäßig zunehmen und

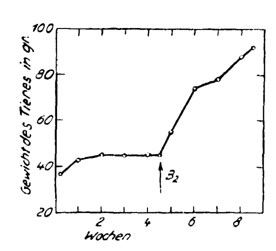


Abb. 77. Grundkost: Sherman-Bourquin-Diät + B_4. (Hefekochsaft durch Fullererde von B_2 befreit, entsprechend 4 g frischer Bäckereihefe pro Tag. Nach $4^1/_2$ Wochen 3γ Laktoflavin pro Tag. (Nach György c. s.)

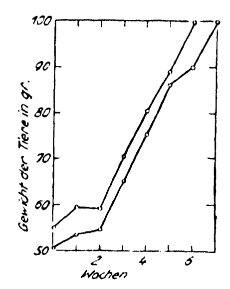


Abb. 78. Malzextrakt mit Frankonit gereinigt als B_4-Quelle. Pro Tag 2 ccm entsprechend 0,5 g Löflunds Malzextrakt. Nach 2 Wochen 10 γ Laktoflavin. (Nach György).

werten die Gewichtszunahme der folgenden 4 Wochen. Dabei gilt als Einheit diejenige Dosis, die in 4 Wochen einen Gewichtsanstieg von wöchentlich 11—14 g hervorzubringen imstande ist. Guerrant-Salmon (l. c. 4) nehmen eine Versuchsdauer von 8 Wochen und als Einheit eine Gewichtszunahme von wöchentlich 12—15 g. Sherman-Bourquin (l. c. 12) definieren die Einheit als diejenige Menge, die imstande ist, in 2—4 Wochen einen Gewichtsanstieg von 10 g (10 g in 30 Tagen) hervorzubringen. Guha und Mitarbeiter (l. c. 14) rechnen mit einer Versuchsdauer von 2—3 Wochen und einer Gewichtszunahme von 10 g als Einheit. Bourquin setzt die Versuchsdauer auf 4—5 Wochen fest, wobei die 1. Versuchswoche verworfen wird. Als Einheit gilt eine Gewichtszunahme von 3 g pro Woche. Alleman fand nach der 5. Versuchswoche keine regelmäßige Gewichtszunahme. Deshalb ist eine Versuchsdauer von 4—5 Wochen vorzuziehen. Auch Booher empfiehlt den 4-Wochenversuch. Nach Smith (l. c. 15) soll sogar ein 10-Tageversuch genügen. Halliday 22) setzt das Gewicht der 2.—5. Woche in Rechnung und verwirft die 1. Woche.

Chick und Roscoe (l. c. 8) hatten früher als Einheit diejenige Substanzmenge verzeichnet, die während eines 8-wöchentlichen Versuchs eine Gewichtszunahme von 50—60 g hervorrief. Bemerkt sei noch, daß die neue Chick-Roscoe-Einheit etwa 3mal größer ist als eine Bourquin-Einheit.

---

22) Halliday, J. of biol. Chem. 99, 164 (1932).

Der kurative Wachstumstest wird neuerdings namentlich von György und Mitarbeitern bevorzugt. Als Einheit gilt allgemein eine Gewichtszunahme von 40 g im 30-Tageversuch. Wir benutzen namentlich die Diät nach Bourquin, auf der die Vorperiode schon nach 1—3 Wochen beendet ist.

Selbstverständlich ist man nicht auf die Berechnung der absoluten Werte angewiesen, sondern kann den Wert eines Präparats auch grammäßig ausdrücken, z. B. Stoffe vergleichen, die zugefüttert dieselben Gewichtszunahmen hervorrufen. Weiter ist es empfehlenswert, wenn die Grunddiät nicht absolut B_2-frei ist, die Gewichtszunahmen relativ gegen die Kontrollen zu werten.

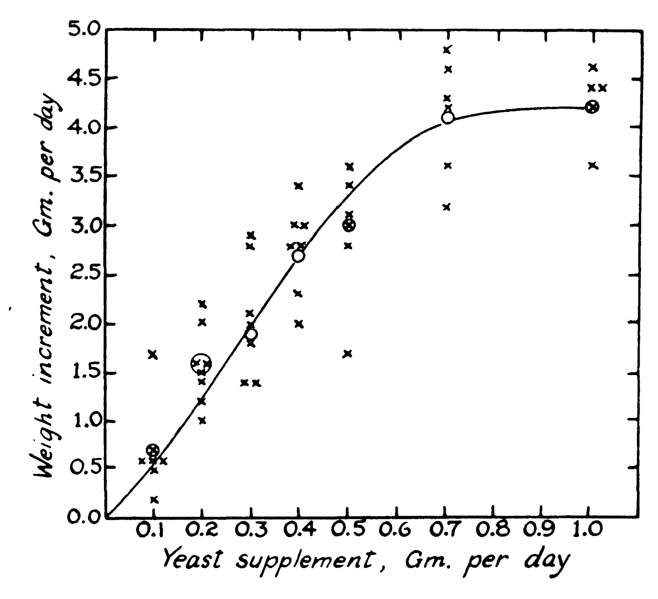


Abb. 79. Tägliche Gewichtszunahme nach Behandlung mit steigenden Hefemengen. (Nach Smith.)

Beispiele nach György und Mitarbeitern gehen aus den Kurven auf Seite 205 hervor:

Beispiel nach Smith (l. c. 15) (Abb. 79):

Je 3 Ratten werden 20 Tage lang mit einer der angegebenen B_2-freien Diäten gefüttert. Dann erhalten die einen täglich 300 mg, die anderen 600 mg Hefe. Nach 10 Tagen zeigt die erste Gruppe eine Gewichtszunahme von 1,3 g pro Tag, die zweite 2,4 g pro Tag. Die Abb. 79 zeigt die Zunahme der auf der Basaldiät lebenden Tiere nach Zulage verschiedener Mengen autoklavierter Hefe pro Tag. Durch Aufstellung einer ähnlichen Kurve mit einem Hefepräparat kann man immer die Versuche auf die Wirksamkeit der Hefe beziehen.

Auswertungsbeispiele gehen aus den Tabellen 76, 77 und 78 hervor.

Neuerdings beschrieben Block und Farquhar (l. c. 21) auch die Anwendung dieser Methode bei Benutzung einer hochgereinigten Diät zur Bestimmung des Vitamins B_2 in Leber und Leberextrakten.

Tabelle 76. Average weekly growth increments of rats on: A, a mixed diet; B, purified diets, deficient in vitamin B_2, and with this vitamin supplied by autoclaved yeast; C, synthetic diets in which vitamin B_2 is supplied by various percentages of cereal products and peas

(Vitamin B_1 supplied in B and C by daily doses of Peters's antineuritic concentrate from yeast)

Material tested	No. of rats observed	Average weekly increase in body-weight for chosen 4 weeks (g.)
A. Mixed diet. Dried or fresh winter milk, white or brown bread, cabbages or carrots. With Quaker oats, wheat bran, sheep's lungs and cods' heads once or twice a week	16 stock rats from 5th—9th week of life	14 ♂ 16; ♀ 12
B. Negative controls. Diet P_2L	15	2
Positive controls. Diet P_2L + autoclaved yeast (0,4 g. daily)	5	12,5
C. Wheat. Whole ground wheat.		
Sample A, Manitoba, 30 %	2	5,5
50 %	10	16
Sample B, English, 50 %	4	12
Wheat germ. Sample A, 7,5 %	4	2,5
15 %	6	9
30 %	6	16
Wheat bran. Sample A. 15 %	4	8
30 %	4	13,5
Wheat "tails" (fine pollard).		
Sample A, 15 %	4	7,5
30 %	4	15
Flour. Top patent. Sample A, 65 %	7	5
Household. Sample A, 65 %	4	5
Maize. Whole ground maize.		
Sample A, white, African, 30 %	4	8,5
50 %	6	11
Sample B, yellow, S. American, 50 %	8	8
Maize germ. meal. Sample B, 15 %	4	2
30 %	3	7
60 %	6	13
Endosperm. Maize "grits."		
Sample B, 65 %	6	5
"Polenta", Italian, 65 %	4	4
Peas. Dried ground "Clipper" peas, 30 %	2	9,5
45 %	5	16

2. Der prophylaktische Wachstumstest

Der prophylaktische Test wird in derselben Weise gehandhabt wie der eben beschriebene kurative.

Ratten desselben Alters und Gewichts werden in Einzelkäfige gesetzt und erhalten eine der Diäten und Wasser ad libitum. Wir verwenden die Bourquin-Shermansche Kost. Die Tiere erhalten gleichzeitig verschiedene Dosen der zu untersuchenden Substanz getrennt zugefüttert. Dabei nimmt man für jede zu prüfende Dosis mindestens 6 Tiere. Eine zweite Gruppe gleichwertiger Tiere erhält eine bekannte Standardlösung des Vitamins, eine weitere Gruppe bleibt unbehandelt.

Tabelle 77. Vitamin B_2 content of vegetables and yeast as demonstrated by the weight increase of rats during 5 weeks on a diet (P2L. YE) complete except for vitamin B_2, together with a daily dose of the vegetable to be tested

Material tested	Dry weight g. daily	No. of rats	Growth in 5 weeks Averages g.
Yeast	0,1	4	50
	0,2	1	75
	0,25	2	85
	0,4	2	110
	10% = 1,0*)	4	110
Watercress	0,2	3	53
	0,3	3	57
	0,4	5	56
Lettuce	0,2	2	44
	0,3	5	46
	0,6	4	57
Cabbage, etiolated leaves	0,2	2	34
	0,3	3	35
	0,4	4	36
	0,8	4	65
Cabbage, dark green leaves	0,2	2	41
	0,4	5	58
	10% = 0,9*)	2	85
Spinach	0,2	3	41
	0,4	5	54
	0,6	4	67
	0,8	4	83
Onion	0,8	2	21
	25% = 1,6*)	4	53

Die Tiere werden wöchentlich 2mal gewogen und die Gewichtskurven registriert. Die Kontrolltiere nehmen nur in der ersten Zeit regelmäßig zu. Nach etwa 2—3 Wochen, oft auch schon früher, wird das Gewicht stationär, die Tiere bleiben aber am Leben.

Wir brauchen eine Versuchsperiode von 4—5 Wochen und dosieren so, daß die Gewichtszunahme pro Woche etwa 12 g beträgt.

Eine Einheit ist diejenige Menge, die in 4—5 Wochen einen Gewichtsanstieg um 50 bzw. 60 g verursacht. Wir haben mit der Methode gute Ergebnisse erzielt.

IV. Chemische Methoden der Flavinbestimmung 22a), 23), 24)

1. Die Lumiflavinmethode

Kochsäfte oder alkoholisch-wäßrige Extrakte der fein zerkleinerten Produkte werden entweder direkt oder nach vorhergehender Adsorption und Elution (s. unten) in alkalischer Lösung unter Kühlung mit dem Licht einer

*) The foodstuffs were in these cases given as a percentage of the diet.

22a) Kuhn c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1454 (1934).
23) Wagner-Jauregg, Angew. Chem. 47, 318 (1934).
24) Warburg-Christian, Biochem. Z. 266, 377 (1933).

Tabelle 78. **Titration of vitamin B_2 by increase of body weight in young rats, which have ceased to grow an "— B_2" diet, i.e. diet L, devoid of B vitamins, to which vitamin B_1 is added as Kinnersley and Peter's concentrate from yeast**

Material tested	Daily dose expressed as the equivalent of dry yeast g.	Rat No.	Body weight when dose was started g.	Weekly growth increments while receiving dose g.	Mean for rats receiving a given dose g.	Time previously maintained on "—B_2" diet Weeks
Fraction 5 I, extract of Yeast V in 0,01% acetic acid evaporated to small bulk	1,2	142	116	36, 32	26	14
	1,2	140	101	24, 12		14
	0,9	243	45	26, 22	24	3
Fraction 5 II, prepared as 5 I, from Yeast V and VII	0,5	254	41	21	21	2
	0,5	255	41	22		2
	0,5	256	43	19		2
	0,25	254	71	14, 11	11	2 + 2 on above test + 2 deprived until weight was again constant
	0,25	255	65	14, 12		
	0,25	256	66	8, 11		
Fraction 5 III, prepared as 5 I, from Yeast VIII	1,0	251	45	24, 28	26	15 + 1 receiving the equivalent of 0,5 g. yeast with no response
	0,5	251	43	2	—	15
	0,5	268	52	20, 15,5	18	6
	0,25	272	53	10,5, 13,5	11	7
	0,25	279	38	16, 17		4
	0,25	280	39	11, 11		2
	0,25	273	56	11, 9,5, 9,5		2 + 2 receiving the equivalent of 0,12 g. yeast
	0,12	273	46	7, 3	7	2
	0,12	290	37	9, 12, 3		2
Dried Yeast	0,4	—	—		23	See Chick and Roscoe [1927], Table III
	0,2	—	—		11	

starken elektrischen Glühbirne bestrahlt. Dabei gehen die Flavine in die ebenfalls grüngelb gefärbten Lumiflavine über, die sich nach dem Ansäuern der Lösung mit Chloroform ausschütteln lassen. Die Bestimmung erfolgt im Stufenphotometer. Die Werte können bei geringem Flavingehalt um etwa 50% zu niedrig ausfallen. Die Frage, ob es Derivate der Flavine gibt, die bei Belichtung nicht chloroformlöslich werden, ist nicht entschieden.

Die mit Chloroform gereinigten Lösungen, die n/2 an NaOH waren, werden in flachen Schalen (Photographierschalen) mit einer 600-Watt-Lampe aus 20 bis 30 cm Abstand belichtet. Die Temperatur darf 20° nicht übersteigen. Die Kühlung erfolgt durch Ventilatoren und durch Wasser (Glasschlangen). Nach zweistündiger Behandlung wird mit Essigsäure angesäuert und mindestens 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform wird über Natriumsulfat getrocknet, auf ein bestimmtes Volumen eingeengt und die Farbstoffkonzentration im Pulfrichschen Stufenphotometer mit dem Filter S 47 bestimmt. Für die Berechnung ist $e = 4,30$ zu setzen (0,100 mg Lumilaktoflavin in 1 ccm Chloroform). Die Umrechnung von Lumilaktoflavin erfolgt durch Multiplikation mit 1,5.

Zur Reinigung ist Adsorption an Fullererde und Elution mit Pyridingemischen vorteilhaft. Die Methode ist für Malzextrakte, Hefeextrakte usw. nicht anwendbar, weil eine große Menge brauner Farbstoffe mit in die Elutionen geht. In solchen Fällen werden die mit Schwefelsäure angesäuerten Kochsäfte mit n/1 Kaliumpermanganatlösung bei 15—20° behandelt, bis keine wesentliche Aufhellung mehr eintritt. Nach dem Neutralisieren mit n/2 NaOH wird durch Zentrifugieren geklärt und direkt in alkalischer Lösung belichtet.

Die Fehlergrenze der Lumiflavinmethode ist für Mengen unter 0,1 mg Lumiflavin erheblich, weil durch die einzuhaltenden Bedingungen ein Teil des Flavins zerstört wird. Die wahren Werte dürften, wenn weniger als 0,1 mg Lumiflavin zur Bestimmung gelangten, um etwa 200—300 % höher liegen. Die Abweichungen betragen bei größeren Mengen nur etwa 20 %.

2. Die Fluoreszenzmethode 22b)

Der Flavingehalt wird durch direkte Fluoreszenzmessung wäßriger Acetonextrakte, aus denen durch Entmischen mit Petroläther die lipoidlöslichen Stoffe entfernt wurden, bestimmt. Fluoreszierende Begleitsubstanzen können zu hohe Werte vortäuschen. Der Lumiflavintest ist spezifischer. Die mit der Fluoreszenzmethode ermittelten Werte stimmen immerhin mit denen des Tierversuchs und der Lumiflavinmethode überein.

3. Die Bestimmung des freien und gebundenen Flavins (l. c. 22a)

Die Trennung erfolgt durch Dialyse in Cellophanschläuchen etwa 17 Stunden bei 0° gegen destilliertes Wasser. Wäßriger Auszug von Spinatblättern (Spinatblätter in flüssiger Luft gefroren und sofort fein zerstoßen, mit kaltem Wasser extrahiert) enthält insgesamt aus 300 g Blättern 87,0 γ Laktoflavin, davon sind etwa 40,5 dialysierbar. Die Flavinbestimmung erfolgt in Innen- und Außenflüssigkeit nach Adsorption an Fullererde und Elution nach der Lumiflavinmethode. Nach Aufkochen des wäßrigen Auszugs dialysiert fast die gesamte Flavinmenge.

In Kuhmilch sind etwa 90 % des vorhandenen Flavins dialysierbar.

V. Flavingehalt verschiedener Substanzen

Nach den chemischen Methoden wurden für verschiedene Substanzen folgende Werte ermittelt:

Tabelle 79. (Nach Warburg-Christian (l. c. 24))

	Flavin pro kg Trockensubstanz mg
Essigbakterien (Bac. Pasteurianum)	15
Bierhefe (Schultheiß-Patzenhofer)	30
Bäckerhefe	36
Milchsäurebakterien (Bac. Delbrückii)	115
Buttersäurebakterien (Clostridium butyr.)	136

22b) v. Euler c. s., Z. physiol. Chem. 223, 105 (1934).

Tabelle 80. (Nach Kuhn c. s. (l. c. 22a))

	Laktoflavin mg
1 Liter Apfelsinensaft, sterilisiert	0,089
1 Liter Apfelsinensaft, sterilisiert	0,069
1 kg Bananen, geschält	0,075
1 kg Aprikosen, getrocknet	0,57
1 kg Hagebutten, frisch	0,069
1 kg Tomatenmark (Boschi-Figli)	0,71
1 kg Karotten, frisch	0,20
1 kg Spinat, getrocknet	5,70
1 kg Spinat, frisch	0,57
1 kg Heumehl (Luzerne)	7,17
1 kg Gras, frisch	1,42
1 kg Kartoffeln	0,075
1 kg Weizenkleie	0,33
1 kg Malzextrakt Löflund	2,10
1 kg Malzextrakt Löflund	1,60
1 Liter helles Bier, Spaten, München . .	0,29
1 Liter Traubensaft, sterilisiert	0,060
1 Liter Weißwein, Pfälzer	0,081
1 Liter Weißwein	0,125
1 kg Tannenhonig, Deutscher Imkerbund 1933	1,060
1 Liter Vollmilch, Kuh	1,00
1 Liter Molke, Kuhmilch, sauer	0,45
1 kg Hefe, trocken, Löwenbräu	18,00
1 kg Vitox (Marmite)	33,00
1 kg Hefeextrakt Cenovis	43,2
1 kg Eieralbumin, trocken	14,1
1 kg Rinderleber, frisch	15,9
1 kg Rattenleber, frisch	15,6
1 kg Dorschleber, frisch	0,53
1 Liter Menschenharn	0,075

Tabelle 81. (Nach Euler und Adler 25))

Untersuchtes Material	Gesamtflavingehalt in γ pro g Frischgew.	Untersuchtes Material	Gesamtflavingehalt in γ pro g Frischgew.
Leber . . . . . . (Rind)	10—20	Auge . . . . (Rind)	
Niere . . . . . . (Rind)	10—20	Netzhaut	1—5
Nebenniere . . . (Rind)	5—10	Pigmentepithel	0,5—1,0
Corpus luteum . . (Rind)	5—10	Auge . . . . . (Schaf)	
Gehirn . . . . . (Rind)	1—5	Netzhaut	1—5
Ovarium . . . . (Rind)		Auge . . (Kaninchen)	0,025—0,5
Stroma	1—5	Auge . . . . . (Huhn)	1—5
Follikelwand	0,025—0,5	Auge . . . . . (Fische)	10—20
Follikelsaft	0,025	Blut . . . . . (Rind)	
Milz . . . . . . (Rind)	0,5—1,0	Vollblut	0,025
Lunge . . . . . (Rind)	0,5—1,0	Serum	0,025
Hypophyse . . . (Rind)		Roux-Sarkom . (Huhn)	0,5—1,0
Vorderlappen	0,5—1,0	Jensen-Sarkom (Ratte)	0,025—0,5
Hinterlappen	0,025—0,5		
Plazenta . . . (Mensch)	0,5—1,0		

25) Euler c. s., Z. physiol. Chem. 233, 108 (1934).

VI. Vorkommen des Vitamins B_2

Außer den Angaben am Schluß dieses Kapitels, die sich aber auf das Vorkommen des Vitamin B_2-Komplexes beziehen, seien hier noch einige weitere Daten aus den Arbeiten von György und Mitarbeiter hervorgehoben (vgl. auch 25a)):

Tabelle 82

Tier	Organ	Tagesdosis (g Frischgewicht)	Gewichtszunahme in 30 Tagen in g
Rind	Herzmuskel	0,5	41
,,	,,	1,0	68
,,	,,	0,5	58
,,	Skelettmuskel	1,0	23
,,	,,	1,5	30
,,	,,	2,0	38
Kalb	Herzmuskel	0,5	34
,,	,,	0,5	39
,,	,,	1,0	68
,,	Skelettmuskel	1,0	35
,,	,,	1,5	42
,,	,,	2,0	51
Huhn	Beinmuskel	1,5	59
,,	Brustmuskel	1,5	28

Leberpreßsaft aus 10 g Frischleber .	27—29 g in 29 Tagen
Campolon, 0,5 ccm	69 g in 30 Tagen
Hefekochsaft, aus 2 g Frischhefe . .	40 g in 28 Tagen
Leber, Niere, 0,2—0,4 g frisch . . .	40 g in 30 Tagen
Preßhefe, 0,5—1,0 g	40 g in 30 Tagen

Zur Umrechnung des Flavingehaltes in Wachstumswirkung sei angegeben, daß die tägliche Zufuhr von 8—10 γ Laktoflavin in 30 Tagen eine Gewichtszunahme von 40 g herbeiführt. Mit 5—7 γ erzielt man bereits gutes Wachstum. Zu beachten ist dabei, daß die Sherman-Bourquin-Kost, die zur Auswertung in Anwendung kam, nicht absolut B_2-frei ist. Namentlich der Weizenschrotextrakt enthält stets Vitamin B_2.

VII. Der Vitamin B_2-Bedarf

Der Vitamin B_2-Bedarf ist während der Laktation besonders groß. An Versuchstieren benötigen Kücken das Vitamin, während Tauben ohne B_2-Zufuhr leben können. Der optimale B_2-Bedarf ist viel höher als sich mit den bisherigen Methoden am Tier bestimmen läßt (Sherman-Ellis 26)). Der Bedarf des Menschen wird auf etwa 150 Ratteneinheiten pro die geschätzt.

VIII. Die chemische Natur des Vitamins B_2 26a)

Das „Wachstumsvitamin“ B_2 wurde 1933 von P. György, R. Kuhn und Wagner-Jauregg 27) in reiner Form isoliert und als Flavin identifiziert. Die Flavine sind Vertreter einer in der Natur weitverbreiteten Farbstoffklasse

25a) Block c. s., J. of biol. Chem. 103, 643 (1933).

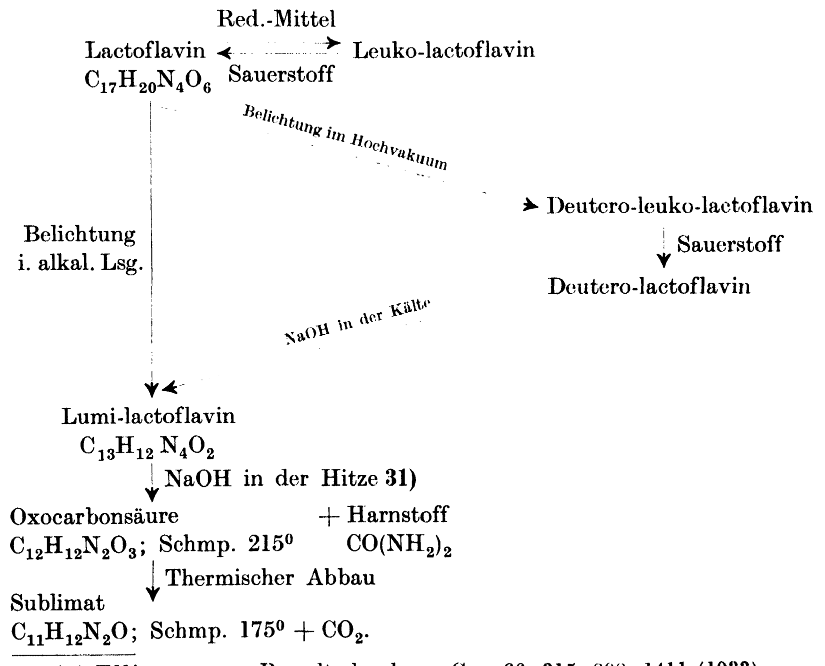
26) Sherman-Ellis, J. of biol. Chem. 104, 91 (1934).

26a) Kuhn c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1220, 1409, 1452, 1460 (1934). — Stern c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1352, 1442 (1934).

27) György-Kuhn-Wagner-Jauregg, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 317, 676, 1034, 1577 (1933); Naturwiss. 21, 560 (1933); Klin. Wschr. 12, 1241 (1933); Z. physiol. Chem. 223 (1934).

der Lyochrome (Ellinger-Koschara 28)). Man bezeichnet die Einzelvertreter als Flavine mit der ihrem Vorkommen entsprechenden Vorsilbe mit Lactoflavin, Ovoflavin, Hepaflavin usw. Bereits 1932 waren Banga-Szent-Györgyi 29) auf dieselbe Farbstoffgruppe gestoßen, als sie ein Atmungskoferment aus Schweineherzkochsaft herstellten, dessen Farbkomponente sie Cytoflav nannten. Warburg und Christian 30) isolierten im selben Jahr aus Hefe ein gelbes Oxydationsferment, dessen Farbkomponente mit dem B_2-wirksamen Flavin identisch ist. Wir haben also die bemerkenswerte Erscheinung, daß ein Vitamin, wenn es an einen kolloidalen Träger gebunden vorliegt, als Ferment fungiert. Die Flavine kommen also in der Natur teils in freier dialysierbarer Form (Kuhmilch), teils an hochmolekulare Träger gebunden vor (Spinat, Rinderleber, Hefe). Die Farbkomponente (Flavin) kann durch Kochen oder Behandlung mit Methanol oder Aceton abgespalten werden. Die Flavine sind stickstoffhaltige wasserlösliche Farbstoffe, deren Lösungen intensiv grün fluoreszieren. Auf Zusatz von Alkalien und Mineralsäuren verschwindet die Fluoreszenz. Bei längerer Belichtung oder bei UV.-Bestrahlung werden die Flavine in irreversibler Weise zerstört. Bei Belichtung in alkalischer Lösung entsteht ein Farbstoff, der sich nach dem Ansäuern der Lösung mit Chloroform ausschütteln läßt (Lumiflavin).

Die bisher erkannten chemischen Umwandlungen der Flavine stellt folgende Tabelle dar 31), 32):



28) Ellinger c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 315, 808, 1411 (1933).
29) Banga c. s., Biochem. Z. 246, 203 (1932).
30) Warburg c. s., Biochem. Z. 254, 438 (1932); 275, 492 (1933); 266, 377 (1933).
31) Kuhn c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1950 (1933); 67, 888 (1934). Letzte Arbeiten 67, 1220, 1409, 1452, 1460, 1826, 1932, 1941 (1934).
32) Wagner-Jauregg, Angew. Chem. 47, 318 (1934).

Der Übergang von Lactoflavin in Lumilactoflavin ist wie folgt zu formulieren:

```
        /CH2 · OH  ┌        ┐   /NH\
HO · HC            │        │—C      CO
     |             │ C9H9N2 │ ‖      |
HO · HC            │        │—C      NH
     \CH(OH)/      └        ┘  \CO/
          Lactoflavin

                    ┌          ┐\ /NH\
  Belichtung        │          │ C      CO
 ──────────→        │ C9H10N2  │ ‖      |
 i. alkal. Lsg.     │          │ C      NH
                    └          ┘ /\CO/
                      Lumi-lactoflavin
```

Die Synthese des Lumilactoflavins wurde neuerdings von Kuhn c. s. und Stern c. s. 33) durchgeführt. Das Lumilactoflavin entsteht durch Kondensation von 1,2-Dimethyl-4-Methylamino-5-Amino-Benzol mit Alloxan. Das Lumilactoflavin ist demnach 6-7-9-Trimethyl-iso-Alloxazin.

```
                                                    CH3
                                                     |
          /\ /NH · CH3    HO\  N          H3C\  /\  /N\  N
H3C—  |    |           +     C    CO   →     |    |    |    CO
H3C—  |    |                O=C    NH        |    |    |    NH
          \/ \NH2               CO        H3C/  \/  \N/  CO
                                                Lumi-Lactoflavin
```

IX. Die Trennung der Vitamine B_1 und B_2

Eine Trennung der Vitamine B_1 und B_2 kann entweder durch Adsorptions-, Fällungs- oder Extraktionsmethoden erreicht werden, wie durch Autoklavieren. Letztere Behandlung zerstört allerdings das Vitamin B_1.

Zur Darstellung einer B_1-freien Hefe autoklaviert man sie am besten bei 120^0 etwa 6 Stunden lang. Die Behandlung zerstört das Vitamin B_1 und schwächt die B_2-Wirksamkeit um 50 %.

Smith 33a) führt eine teilweise Trennung durch Extraktion herbei. Trockne Hefe wird mit 70—76 %igem Alkohol mit oder ohne Zusatz von 1 % Salzsäure extrahiert. Das Vitamin B_1 geht nahezu quantitativ in Lösung, während das Vitamin B_2 sich im Heferückstand findet.

Adsorptionsverfahren wurden von Levene, Salmon u. a. beschrieben. Levene 34) schüttelt eine Rohlösung der Vitamine aus Hefe 7 mal mit Silicagel bei $p_H = 3$. Das Filtrat enthält das gesamte Vitamin B_2. Es wird mit LiOH neutralisiert, eingeengt und mit Aceton gefällt. Der Niederschlag ist wirksam in Mengen von 15 mg pro die. Zur weiteren Reinigung werden 3 g dieses Nieder-

33) Holiday-Stern, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1352, 1442 (1934).
33a) Smith, J. of biol. Chem. 100, 225 (1933).
34) Levene, J. of biol. Chem. 79, 465 (1928); Science 71, 668 (1930).

schlags in 10 ccm Wasser gelöst und die Lösung in dünnem Strahl in Alkohol (5%ig an 70%iger HJ) eingetragen. Der Niederschlag wird gewaschen, bis Jod aus dem Waschwasser verschwindet. Er ist B_2-wirksam in Dosen von 5—10 mg pro die. Eine weitere Anreicherung kann erzielt werden durch Fällung der wäßrigen Lösung mit einer 1%igen Salzsäurelösung in Alkohol. Der dann entstehende Niederschlag wirkt bereits in Mengen von 0,7 mg pro die.

Das Verfahren von Levene wurde neuerdings von Diehl und Kühnau 35) zur Anreicherung des Vitamins B_2 angewandt. Sie gingen folgendermaßen vor: „4,8 kg feuchte, würzehaltige Bierhefe wurden auf großen Nutschen trocken gesaugt, mit Wasser verrührt, wieder abgesaugt, in 9,6 Liter 0,1%ige Essigsäure eingetragen, unter starkem Rühren zum Sieden gebracht und 5 Minuten im Kochen gehalten (Chick, Roscoe). Nach dem Abkühlen wurde filtriert und das blaßgelbe Filtrat mit dem doppelten Volumen Aceton versetzt, wobei ein grobflockiger, gut absitzender Niederschlag ausfiel. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wurde dekantiert, der Niederschlag scharf abgesaugt, in 6 Liter Wasser gelöst, die Lösung mit 1200 g Kieselsäuregel (Acid. silicic. gelatinos. Merck) versetzt, mit n/10-H_2SO_4 auf p_H 3 gebracht und 1 Stunde mechanisch gerührt. Dann wurde auf mehreren großen Filtern abfiltriert, das Filtrat mit Lithiumhydroxyd neutralisiert, im Vakuum bei 50—60° eingeengt, bis das Gesamtvolumen 300 ccm betrug. Diese Lösung wurde durch Zusatz der doppelten Menge Aceton ausgefällt, der Niederschlag in 20 ccm Wasser gelöst und in eine Mischung von 100 ccm 96%igem Alkohol und 1 ccm 70%iger Jodwasserstoffsäure eingegossen. Die nunmehr entstehende Fällung wird mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Alle Manipulationen wurden unter möglichstem Ausschluß von Licht vorgenommen (vgl. dazu Kuhn, György und Wagner-Jauregg). Es wurden so schließlich 624 mg eines hellgrauen Pulvers erhalten. 10 mg des gereinigten Vitaminpräparates entsprechen nach Levene in bezug auf die B_2-(Wachstums-)Wirkung etwa 5 g Preßhefe."

Salmon-Guerrant und Hays 36) adsorbieren das Vitamin B_1 aus Hefeextrakt an Fullererde bei $p_H = 3$. Das Vitamin B_2 findet sich im Filtrat. Das Filtrat der Fullererde wird im Vakuum eingeengt und mit Alkohol bis 51% versetzt. Der entstehende Niederschlag wird 2mal mit 51%igem Alkohol gewaschen und die Filtrate im Vakuum konzentriert. Der Extrakt wird auf Stärke getrocknet (auf 0,32 g Stärke Extrakt aus 1 g Hefe).

Fällungsverfahren zur Trennung der beiden Vitamine werden von Guerrant-Dutcher, l. c. 9) angewandt. Ein wäßriger Hefeextrakt wird eingeengt und mit Alkohol bis zur Konzentration von 50% versetzt. Der Niederschlag wird verworfen und das Filtrat mit Alkohol auf eine Konzentration von 80% gebracht. Man filtriert den entstehenden Niederschlag ab und trocknet ihn. Zur vollständigen Zerstörung des Vitamins B_1 wird er in Autoklaven 6 Stunden erhitzt. Der feingepulverte Niederschlag wird mit Kornstärke oder Dextrin in einem solchen Verhältnis gemischt, daß 0,3 g etwa 1 g Hefe entsprechen.

Rosedale 37) geht bei der Darstellung eines B_1-freien B_2-Extrakts von Reisschalen aus und extrahiert sie mit 1%iger Essigsäure. Die Lösung wird im Vakuum eingeengt, daß 1 ccm 1 g Reisschalen entspricht. Man fällt bei neutraler Reaktion mit Bleiacetat und zerlegt den B_2-haltigen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat wird entweder als solches benutzt oder auf Stärke getrocknet.

---

35) Diehl c. s., Dtsch. Arch. klin. Med. 176, 140 (1933).
36) Salmon c. s., J. of biol. Chem. 80, 91 (1928).
37) Rosedale, Biochemic. J. 21, 1266 (1927).

Chick-Roscoe 38) wenden dieselbe Methode auf Hefeextrakte an und fällen in neutraler oder schwach alkalischer Lösung. Ein Hefeextrakt wird mit konzentrierter Salzsäure bei $p_H = 1{,}5$ 1 Stunde lang auf 100° erhitzt und die Lösung dann mit Natronlauge bis $p_H = 7{,}5$ versetzt. Man fällt mit Bleiacetat (10%ige Lösung), wäscht den Niederschlag und zerlegt ihn bei $p_H = 3$ mit Schwefelwasserstoff. Die Lösung wird schließlich neutralisiert und soweit eingeengt, daß 1 ccm 1 g Hefe entspricht.

Sämtliche B_2-Extrakte finden Verwendung bei der Rattenwachstumsmethode auf Vitamin B_1.

X. Darstellung des Vitamins B_2 nach György und Mitarbeiter

Darstellung eines Leberkochsafts: Frische Rinderleber wird fein zerkleinert und durch eine Fleischhackmaschine gedreht. 1500 g des erhaltenen Leberbreies werden in 2500 ccm destilliertes kochendes Wasser eingetragen und das Kochen unter gutem Rühren 8 Minuten fortgesetzt. Es wird noch warm abgesaugt und der Rückstand mit 500 ccm Wasser gewaschen. Der Extrakt verliert unter Toluol im Tageslicht nach einigen Monaten seine Wirksamkeit (daher braune Flaschen). Die Ausbeute beträgt bei Kochsäften aus Hefe, Niere, Leber und Herz etwa 50—80% der ursprünglichen Wirksamkeit. Sie bleibt nicht selten auch darunter.

Fällungsverfahren

Bleifällung: Der Leberkochsaft wird mit gesättigter Bleiacetatlösung versetzt, bis keine weitere Fällung erfolgt (etwa 100 ccm). Man läßt den Niederschlag absitzen und hebert die Lösung ab. Der Niederschlag wird einige Male mit warmem destilliertem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nur noch sehr schwach gefärbt ist.

Zerlegung des Bleiniederschlags: Der Niederschlag wird in heißem Wasser suspendiert und in geringem Überschuß mit 2 n Schwefelsäure versetzt (Kongo soll rein Blau werden). (Zur besseren Suspension schüttelt man den Niederschlag mit dem Wasser etwa ½ Stunde auf der Maschine.) Man zentrifugiert und schüttelt das Bleisulfat 1—2mal mit etwas überschüssiger verdünnter Schwefelsäure, bis die abzentrifugierte, trübe Flüssigkeit nur noch schwach gefärbt ist. (Wenn Schaumbildung, einige Tropfen Octylalkohol zugeben.) Das Flüssigkeitsvolumen soll 600—800 ccm betragen.

Fällung mit Phosphorwolframsäure: In einer kleinen Probe der Lösung ermittelt man gegen Kongo durch Titration mit Natronlauge den Gehalt an freier Säure und fügt soviel 50%ige Schwefelsäure zu, daß die Lösung 5 Vol.-%ig ist. Diese Lösung fällt man mit der eben ausreichenden Menge Phosphorwolframsäure (100 g Phosphorwolframsäure + 500 ccm 5 Vol.-%iger Schwefelsäure). Das Vitamin bleibt in Lösung. Aus dem Filtrat entfernt man die überschüssige Phosphorwolframsäure durch Ausschütteln mit Amylalkohol. (Der Amylalkohol kann immer wieder benutzt werden, wenn man die Phosphorwolframsäure daraus durch Schütteln mit Natronlauge entfernt.) Zur besseren Trennung der Schichten gibt man etwas Äther zu. Nach dem Ausschütteln wird der in der wäßrigen Schicht gelöste Amylalkohol mit Äther und dieser mit Petroläther ausgeschüttelt. (Alle Phosphorwolframsäure ist entfernt, wenn eine Probe der Lösung beim Erhitzen mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure und Zinkspänen farblos bleibt oder sich nur ganz schwach blau färbt.)

Fällung mit Silbernitrat: Man versetzt die Lösung mit 25%igem Silbernitrat, bis kein weiterer Niederschlag entsteht und verwirft ihn. Das Filtrat wird

38) Chick-Roscoe, Biochemic. J. 23, 504 (1929).

mit 2 n NaOH neutralisiert, bis Kongopapier nicht mehr rein blau sondern blauviolett ist. Dabei tritt gewöhnlich ein schwacher Niederschlag auf, den man absitzen läßt. Die klare Lösung wird weiter mit Natronlauge bis zum Neutralpunkt (Lackmus) versetzt. Man fügt Silbernitrat zu, bis keine weitere Fällung erfolgt. Die Lösung wird dabei wieder sauer, so daß man wieder durch Zusatz von Natronlauge neutralisiert und weiter Silbernitrat zugibt, bis die Fällung vollständig wird. Die überstehende Lösung soll farblos sein. Die Fällung wird bei gedämpftem Licht ausgeführt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit wenig warmem Wasser gewaschen.

Zerlegung des Silberniederschlags: Die Zerlegung geschieht in derselben Weise wie oben, mit dem Unterschied, daß man hier 2 n Salzsäure verwendet. Ein Überschuß an HCl soll vermieden werden. Die Lösung muß aber auch noch nach dem Schütteln Chlorionen enthalten.

Alkoholfällung: Die salzsaure Lösung wird mit Natronlauge genau neutralisiert und im Vakuum auf 75 ccm eingeengt. Ein dabei ausfallender Niederschlag wird verworfen. Die Lösung wird mit dem 12,5fachen Volumen absolutem Alkohol unter Rühren versetzt und der zähe Niederschlag, der zur Hauptsache aus Glykogen und Salzen besteht, abzentrifugiert. Man wäscht mit wenig 96%igem Alkohol und engt das Filtrat im Vakuum auf ein kleines Volumen ein (40—60). Die erhaltenen Lösungen sind gelb, mit stark grüner Fluoreszenz. Die Ausbeute an Vitaminwirksamkeit beträgt nur 3,3—10%. Aus 5—15 g Leber erhält man eine Einheit. Wirksamkeit: 3—5 mg pro Einheit.

Adsorptionsverfahren

Zu 450 ccm Leber- oder Herzkochsaft gibt man 37 ccm konzentrierte Salzsäure und entfernt einen entstehenden Niederschlag. Die Lösung wird mit 2,5 kg Fullererde 1 Stunde gerührt. Man zentrifugiert und wäscht mit destilliertem Wasser, bis das Filtrat chlorfrei ist. Die Fullererde wird darauf mit einer Mischung aus 120 ccm destilliertem Wasser, 30 ccm Methanol und 30 ccm Pyridin ½ Stunde gerührt. Das Filtrat wird (Eluat) im Vakuum eingeengt (auf 60 ccm bei 60° Badtemperatur). Man versetzt die Lösung mit demselben Volumen Methanol und engt auf 20 ccm ein. Die Lösung wird soweit verdünnt, daß 1 ccm 1 g Herz entspricht. Sie enthält dann etwa 0,8 mg Trockensubstanz pro Kubikzentimeter.

Auch aus dem Leberextrakt Campolon kann das Vitamin gewonnen werden. Man behandelt das Campolon bei neutraler Reaktion mit Fullererde. Vgl. auch die Darstellung der Flavine bei Ellinger-Koschara 39).

Darstellung eines B_2-Konzentrats nach Booher 40)

Ausgangsmaterial der Darstellung ist Molkentrockenpulver, das etwa 14,3% Asche, 5,7% N und 52,7% Laktose enthält. Die Wirksamkeit des Materials beträgt 20 Sherman-Bourquin-E. pro Gramm. Das Trockenpulver wird wiederholt mit Alkohol ausgekocht und die gekühlten Extrakte vom Laktoseniederschlag befreit. Man engt im Vakuum auf 1 Liter ein (40—50°!). Der Rest wird im Exsikkator über Schwefelsäure zur Trockne gebracht. Ausbeute: Aus 500 g Molkentrockenpulver 38—43 g. Wirksamkeit 80—123 E. pro Gramm. — 42 g dieses Materials werden 3mal mit je 300, 300 und 120 ccm einer Mischung von Chloroform-Äthylalkohol 2 : 1 am Rückflußkühler in Stickstoffatmosphäre gekocht. Die erhaltenen gelben, grünfluoreszierenden Extrakte werden im Vakuum eingeengt und die letzten Flüssigkeitsreste im Exsikkator entfernt. Ausbeute: 9—10 g Substanz, Wirksamkeit 125 E. pro Gramm. — Die erhaltene Substanz wird mit wasserfreiem Äther 17 Stunden lang im Soxhletapparat extrahiert. Der Rest wiegt etwa 1,5 g und besitzt eine Wirksamkeit von 1000 E. pro Gramm. Die Substanz ist rotorange und sehr hygroskopisch.

---

39) Ellinger c. s., Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1411 (1933).
40) Booher, J. of biol. Chem. 102, 39 (1933).

XI. Die Darstellung des Laktoflavins [41]

300 Liter Labmolke aus frischer Kuhmilch werden mit 24,6 Liter konzentrierter Salzsäure versetzt und mit 2,4 kg Fullererde 1,5 Stunden gerührt. Man läßt absitzen, hebert die überstehende Flüssigkeit ab und wäscht das Adsorbat solange mit destilliertem Wasser, bis sich mit Silbernitrat kein Chlorion mehr nachweisen läßt. Zur Elution wird 1,5 Stunden mit einer Mischung von 2,7 Liter Pyridin, 2,7 Liter Methanol und 10,8 Liter destilliertem Wasser gerührt. Man zentrifugiert, engt die Elutionsflüssigkeit im Vakuum auf ein kleines Volumen ein und bringt kolloidal gelöste Fullererde durch Zusatz des gleichen bis doppelten Volumens Methanol zum Ausflocken. Die abzentrifugierte Farbstofflösung wird im Vakuum vom Methanol befreit und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, dann mit dem 10fachen Volumen Aceton versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Filtrieren wird im Vakuum auf 350 ccm eingeengt und der Farbstoff erneut durch ¾stündiges Schütteln mit 42 g Frankonit (KL) adsorbiert. Aus dem mehrfach gewaschenen Adsorbat eluiert man das Laktoflavin mit 75 ccm Pyridin + 200 ccm Methanol + 100 ccm Wasser.

Die zweite Elution wird unter 15 mm auf 75 ccm eingeengt, mit 2 ccm Eisessig und 1000 ccm Aceton versetzt und nach Abzentrifugieren des ausfallenden Niederschlags erneut im Vakuum, diesmal bis auf 8 ccm eingeengt. Während des Einengens treten immer wieder farblose Fällungen auf, von denen abzentrifugiert werden muß. Die klare konzentrierte Lösung wird mit gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt, wodurch Kreatinin und andere Begleitstoffe ausgefällt werden, während das Lactoflavin in Lösung bleibt. Die Entfernung überschüssiger Pikrinsäure erfolgt durch Extraktion im Dunkeln mit Äther. Engt man die ausgeätherte Lösung im Vakuum ein, so scheidet sich der Farbstoff kristallinisch ab. Zur Reinigung wird 3mal aus kochender 2 n Essigsäure umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 6 mg.

Die Darstellung des Ovoflavins

Getrocknetes Eieralbumin oder geschlagene Eier werden mit Methylalkohol extrahiert. Der Extrakt wird wie oben mit Fullererde behandelt und das Vitamin mit Wasser-Methanol-Pyridin eluiert. Man erhält durch Fällung mit Silber ein braunrotes Silbersalz, das mit Schwefelwasserstoff zerlegt wird. Aus Essigsäure umkristallisiert, bildet die Substanz orangefarbige Kristalle.

Die Ausbeute aus 10000 Eiern oder 30 kg getrocknetem Eieralbumin beträgt 30 mg.

XII. Eigenschaften des Vitamins B_2 (Flavin)

Tabelle 83

Löslichkeit	Löslich in Wasser; Lösung bei Zimmertemperatur, gesättigt bei 0,025 %; wenig löslich in Alkohol; unlöslich in Äther, Aceton, Benzol, Chloroform usw.
Farbe der Lösung	Neutrale wäßrige Lösung grüngelb, intensiv gelbgrüne Fluoreszenz; verschwindet durch Alkalien und Mineralsäuren.
Säuren, Oxydationsmittel, Brom, salpetrige Säure. .	Sehr beständig, Acetylierung mit Essigsäureanhydrid gibt Tetraacetylderivat.
Reduktionsmittel	Durch Natriumhydrosulfit, Zinkstaub oder katalytisch erregten Wasserstoff leicht zur farblosen Hydroverbindung reduziert. Leukoflavine. Bei Schütteln mit Luft zu Flavin rückgebildet

41) Kuhn-György-Wagner-Jauregg, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 576 (1933).

Belichtung, UV.-Bestrahlung	Unter starkem Ausbleichen irreversibel zerstört. Belichtung in alkalischer Lösung führt zum Lumiflavin, das nach Ansäuern chloroformlöslich wird. In Farbe und Spektrum dem Flavin ähnlich. $C_{13}H_{12}N_4O_2$. Belichtung im Hochvakuum führt zum Deutero-leuko-Laktoflavin. Daraus entsteht mit Sauerstoff Deutero-Laktoflavin.
Fällbarkeit	Nicht gefällt durch Phosphorwolframsäure, Silbernitrat, Pikrinsäure oder Merkurisulfat in saurer Lösung, gefällt durch Bleiacetat, Silbernitrat in neutraler Lösung.
Adsorption	Gut adsorbiert an Fullererde in 1 n mineralsaurer Lösung, Frankonit (Pfirschinger Mineralwerke, Kitzingen am Main), bei neutraler Reaktion. Adsorbierbar an Bleisulfid. Eluiert durch Pyridin-Methanol-Wasser-Gemische.
Alkalibeständigkeit	Gering. B_2-Konzentrat aus Rinderherz in 0,25 n NaOH nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur zerstört.
Temperaturbeständigkeit .	Abhängig vom p_H der Lösung. Durch trockene Erhitzung leichter zerstört, als in Lösung. Verlust bei Erhitzung in alkalischer Lösung erheblich. In saurer Lösung sehr beständig.
Wirksamkeit	Laktoflavin (braunrote Nadeln vom Schmelzpunkt 267 Z.) liefert bei täglicher Verabreichung von 1 bis 10 γ 1 Ratteneinheit. (40 g Gewichtszunahme in 30 Tagen.) Warburgs Ferment wirkt entsprechend dem Flavingehalt. Ovoflavin ist weniger wirksam. Lumiflavine sind wirkungslos. Bestrahlung einer Flavinlösung vernichtet die Wirksamkeit.
	Leber und Hefekochsäfte vermögen dauerndes Wachstum der Ratten nur bis zu einem Gewicht von etwa 130—150 g zu unterhalten. Dann stellt sich eine Abflachung der Gewichtskurve ein, die auch durch Vervielfachung der Hefekochsaftmenge nicht zu verhüten ist. Es handelt sich hier vielleicht um das Fehlen eines wasserunlöslichen Vitamins, das bei der Herstellung des Kochsafts im Rückstand bleibt. (Faktor R. ?)

Das Vitamin B_6 (Antipellagravitamin)[1]

I. Die Avitaminose B_6

Die Beobachtungen von Leader-Sure und Smith sowie von Kik, die reine Pellagra ohne Wachstumsstillstand erzeugen konnten und Wachstumsstillstand ohne Pellagra sahen, ließen schon früher eine komplexe Natur des Vitamins B_2 vermuten. Bewiesen wurde die Existenz eines spezifischen, vom B_2 verschiedenen Pellagrafaktors erst neuerdings von György. Es gelang ihm, an der Ratte durch Verfütterung einer reichlich B_2-haltigen Kost typische Pellagra zu erzeugen. Das Antipellagravitamin erhielt die Bezeichnung B_6.

1) György, Nature (Lond.) 133, 498 (1934).

1. Die Pellagra 2)

Die Pellagra, über deren Zustandekommen früher die verschiedensten Ansichten herrschten, ist in ihrer gewöhnlichen Erscheinungsform sicher keine reine Avitaminose. Sie ist wahrscheinlich durch den Mangel des gesamten Vitamin B_2-Komplexes und durch den Mangel gewisser Aminosäuren kompliziert. Die Symptome der Pellagra lassen sich in vier Gruppen teilen:

1. Hautveränderungen, die in einem symmetrischen Erythem bestehen, das besonders an den unbedeckten Stellen der Haut auftritt und scharf rot umrandet ist. Meist nach vorausgegangener Blasenbildung tritt Abschuppung ein, unter Bildung einer braun-schwarzen Pigmentation. Das Erythem kann durch Sonnenbestrahlung ausgelöst werden.
2. Veränderungen am Verdauungstrakt, die besonders zu Beginn der Erkrankung auftreten und alle Erscheinungsformen einer chronischen Gastroenterokolitis aufweisen. Veränderungen an der Leber sind ebenfalls zu beobachten.
3. Störungen der Psyche und des Zentralnervensystems, schwere Psychosen, Spasmen, Reflexstörungen, Neuritiden.
4. Störungen der Blutbildung, besonders Entwicklung einer Anämie vom Perniziosatyp.

2. Die experimentelle Rattenpellagra

Sämtliche Erscheinungen der menschlichen Pellagra finden sich bei der experimentellen wieder, soweit sie durch den Entzug des gesamten B_2-Komplexes erzeugt wurde. Dann finden wir neben dem Wachstumsstillstand als erstem Zeichen einer Schädigung typische Hautveränderungen, aber auch Veränderungen am Verdauungstrakt usw. Reine Pellagra ohne Komplikationen hat neuerdings György erzeugt.

1. Hautveränderungen:

B_2-(Komplex-)arm ernährte Tiere zeigen ein struppiges Haarkleid. Schwanz und Ohren sehen anämisch aus. Nach etwa 6 Wochen entwickelt sich eine symmetrische Schwellung und Rötung der Augenlider, der Ohren und auch der Vorder- und Hinterpfoten, meist anfangend an den Zehengliedern. Wenige Tage später ist die Rötung verschwunden. Die Haare fallen aus, wobei sich an den scharf umrissenen Stellen eine schuppende Dermatitis entwickelt. Die Haut wird schließlich trocken und atrophisch. Konjunktivitis führt zu Verklebungen der Augen. Juckreiz veranlaßt die Tiere sich zu kratzen, wobei blutige Verletzungen auftreten. Der Augapfel ist aber, im Gegensatz zur Xerophthalmie, unverändert. Der Haarausfall führt zu nackten Ringen um die Augen (Brillenbildung), bisweilen ist das ganze Gesicht haarlos, die Haut dünn und rot.

Die Dermatitis erscheint gewöhnlich zuerst an der Rückseite der Pfoten, am Rücken, an der Schulter und an den Schenkeln. Bisweilen tritt auch bilateral symmetrisch Hyperämie mit Haarausfall und Abschuppung der Epidermis ein (Schulter, Rücken, Extremitäten), wie wir es bei der Handschuhbildung der Pellagra finden.

---

2) Stepp c. s., Die Pellagra in Klin. Fortbildg 1933.

Seitlich der Mundschleimhaut und der Nasenlöcher treten meist papillenartige Wucherungen auf, die zu Epidermisabschuppungen und Exudatbildung führen. Rötung und Ulzeration der Mundschleimhaut sind häufig, doch zeigt die Zunge meist keine Veränderungen.

Mitunter sind bei nicht vollständigem Vitaminmangel der Kost die Haare an der Hautlinie abgebrochen, so daß die Tiere wie geschoren aussehen. Bei ganz schweren Fällen konnte Verlust ein oder beider Ohren oder der Zehen

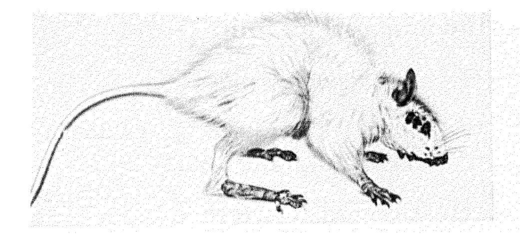
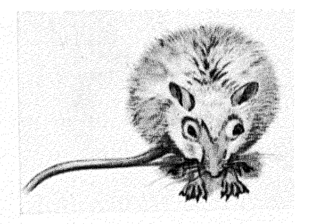



Abb. 80. Rattenpellagra. (Nach Scheunert.)

festgestellt werden. In solchen Fällen waren die Veränderungen der Haut nicht mehr durch Zugabe des Vitamins zu beeinflussen.

Die vorstehende Abb. 80 nach Scheunert und Schieblich zeigt eine Pellagra-Ratte. (Die Originalabbildung ist farbig, doch sind die typischen Veränderungen auch hier deutlich ersichtlich.)

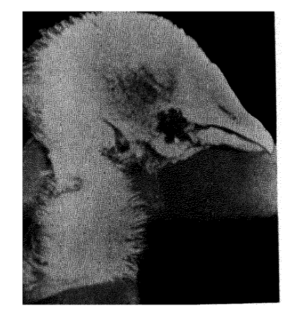


Abb. 81. Pellagra bei Kücken. (Nach Kline c. s.)

2. Veränderungen am Verdauungstrakt:

Veränderungen am Verdauungstrakt kommen bei der experimentellen B_2-(Komplex-)Avitaminose häufig vor. Diarrhöen und blutige Stühle werden beobachtet. Häufig ist auch der Urin rotgefärbt. Auch Erscheinungen, wie sie Fujimaki für Vitamin A-Mangel beschreibt, kommen zur Beobachtung.

3. Veränderungen am Nervensystem:

Ähnliche Veränderungen am Nervensystem, wie bei der menschlichen Pellagra, treten auch bei der Ratte auf. Findlay beschreibt weiter Charakterveränderungen der Ratte (Bissigwerden sonst zahmer Ratten) durch B_2-(Komplex-)arme Ernährung. Solche Tiere zeigen oft erhöhte Erregbarkeit, die an Beriberi erinnert. Die pathologischen Veränderungen der experimentellen Pellagra haben besonders Findlay und Mitarbeiter studiert.

4. Veränderungen der Blutbildung:

Manche der B_2-(Komplex-)arm ernährten Ratten zeigen typische Veränderung der Blutbildung. Vor allem beobachtet man eine schwere Anämie vom Perniziosatyp.

Die experimentelle Pellagra ist wie die menschliche komplexer Natur und ist in der Art, wie sie bisher erzeugt wurde (durch Verfütterung der unter Vitamin B_2 angeführten Mangeldiäten) nicht nur eine B_6-Avitaminose. Sie beruht auf dem Fehlen des Wachstumsvitamins B_2 und wahrscheinlich auch auf Fehlen des extrinsic faktors. Spezifisch auf B_6-Mangel beruhend ist nur die symmetrische Dermatitis.

3. Experimentelle Pellagra bei anderen Tieren 3a), 3b)

Bei Verfütterung einer B_2-(komplex-)freien Kost an junge Kücken (Alter 1 Tag) entsteht neben Wachstumsstillstand eine Erkrankung, die als pellagraähnlich bezeichnet wird. Es entwickeln sich an Schnabel, Beinen, Füßen dermatitisartige Erscheinungen. Die Befiederung bleibt zurück, die Federn sind rauh. Die Tiere rupfen sich dauernd. An den Mundwinkeln treten krustenartige Ablagerungen auf, die sich weiter ausdehnen (s. Abb. 81). Die Tiere gehen etwa 2 Wochen nach Beginn der Erkrankung ein.

II. Die Testmethoden auf Vitamin B_6

A. Auswahl und Haltung der Versuchstiere

Auswahl und Haltung der Versuchstiere erfolgt nach den unter Vitamin B_2 angegebenen Regeln.

B. Kostmischungen für den Testversuch

Da man bisher die Unterscheidung der Vitamine B_2, B_6 usw. nicht vornahm, arbeitete man stets mit denselben Kostmischungen, die man als B_2-frei bezeichnete (s. unter B_2). Man erreichte damit in den meisten Fällen eine reine B_2-Avitaminose, also nur Wachstumsstillstand. Bei fortgesetzter Fütterung trat allerdings in etwa der Hälfte der Fälle eine Dermatitis hinzu. Zur Erzeugung der reinen B_6-Avitaminose gibt György eine Kost aus:

Casein Glaxo	18%
Reisstärke	68%
Butterfett	9%
Lebertran	1%
Salzgemisch	4%

Die Mischung wird durch Vitamin B_1 (hochgereinigtes Präparat von Windaus, das in 8—12 γ 1 Taubentagesdosis enthält) und durch täglich 8—12 γ Laktoflavin (B_2) ergänzt. Um B_4-Mangelsymptome auszuschalten, wird reichlich B_1 gegeben (4—6 Taubeneinheiten pro Tag).

Auch auf der Sherman-Bourquin-Kost (s. B_2) ist es möglich, typische Pellagra hervorzurufen, wenn sie durch B_1 und durch B_2 ergänzt wird. Als B_2-Zugabe erwies sich neben dem Flavin in diesem Falle das Weiße des Hühnereis (täglich 3—5 ccm) als besonders geeignet. Auch auf anderen B_2-freien Kostmischungen läßt sich durch Ergänzung mit B_1 und B_2 die typische B_6-Avitaminose erzeugen.

Nach Kellog und Eddy 3c) beruht die Entstehung der Pellagra ebensosehr auf der Überdosierung des Vitamins B_1, wie auf der Anwesenheit zu kleiner B_2-Dosen. Das Vitamin B_1 soll der im Mais schon früher vermutete toxische Stoff sein. Alle pellagraerzeugenden Kostformen (Mais, Zerealien) sind sehr B_1-reich aber B_2-arm.

3a) Norris-Ringrose, Science 71, 6643 (1930).
3b) Kline c. s., J. of biol. Chem. 99, 295 (1932/33).
3c) Kellog c. s., Science (N. Y.) 1933, 609.

C. Die einzelnen Testmethoden

Früher benutzte man als Test auf das Vitamin B_2 (Komplex) neben dem Wachstumstest öfter die Dermatitisheilung als Kriterium der Wirkung. Man nahm dabei an, daß es sich bei der Auswertung um ein und dasselbe Vitamin handle, zumal stets eine auffallende Parallelität zwischen Wachstumswirkung und Dermatitis heilender Wirkung verschiedener Substanzen gefunden wurde. Heute wird man natürlich bei der Auswertung des Vitamins B_6 von der reinen Avitaminose nach György ausgehen müssen. Da György noch keine ausführliche Beschreibung der Auswertung des Antipellagravitamins mitgeteilt hat, wird im folgenden die bisher übliche Technik gebracht.

Die Dermatitisheilung als Testobjekt

Vor der Entdeckung des Vitamins B_6, des spezifischen Antipellagravitamins, versuchte man mit B_2-(Komplex-)freien Nahrungsgemischen bei der Ratte Pellagra zu erzeugen. Das gelang aber nur in einem gewissen Teil der Fälle. Auf der Sherman-Bourquin-Diät haben wir z. B. nie Pellagra gesehen. Die Ursache des Nichtauftretens der Dermatitis wurde dem Kohlenhydratgehalt der Kost und der Natur der Kohlenhydrate zugeschoben. Man nahm an, daß ein Ersatz der Stärke durch Rohrzucker Dermatitis verursache (Hogan 4)). Leader konnte auf einer kohlenhydratfreien Kost überhaupt keine Pellagra erzeugen 5). Glanzmann 6) erzielte mit einer 40% Rohrzucker enthaltenden Kost bei Ratten pellagraähnliche Erscheinungen. Von mancher Seite wurde bereits früher darauf hingewiesen, daß die Pellagra dann leichter hervorzurufen sei, wenn die Kost Vitamin B_2 (Komplex) in Spuren enthalte. Auch ein Überschuß von Vitamin B_1 wurde als notwendig diskutiert. Die im folgenden beschriebene Methode beruht auf Untersuchungen mit B_2-Komplex-freier Kost.

Die Dermatitis entwickelt sich bei B_2-komplex-frei ernährten Ratten in etwa 57% der Fälle. Die ersten Symptome der Pellagra erscheinen in der 10. Versuchswoche. Die Schwankungen sind erheblich und betragen 5—22 Wochen. Die Jahreszeit ist ohne Einfluß auf die Entstehung der Dermatitis. Auch die Gewichtszunahme der Tiere während des Versuchs spielt keine Rolle. Die Dermatitis soll nach den Untersuchungen von Roscoe genau so schnell auf einer Kost entstehen, die rohes Casein enthält und nicht hochgereinigtes.

Es ist wichtig, für die Auswertung des Vitamins nur Tiere zu nehmen, die etwa gleichartig erkrankt sind. Roscoe teilt die Erscheinungen der Dermatitis je nach der Schwere in drei Stadien ein. Im ersten Stadium sind nur wenige Veränderungen an Füßen, Nase und Ohren bemerkbar. Im zweiten Stadium besteht eine ausgesprochene Dermatitis an den Beinen, an der Nase, Ohren usw. Im letzten Stadium sind dieselben Veränderungen viel ausgeprägter. Für den Test sind nur die Tiere von Stadium 1 und 2 brauchbar. Aus folgender Tabelle gehen Auswertungsbeispiele nach Akroyd-Roscoe 7) hervor:

---

4) Hogan, J. of biol. Chem. 100 (1933).
5) Leader, Biochem. J. 24, 1172 (1930).
6) Glanzmann, Z. f. Vitaminforschg 1934.
7) Akroyd-Roscoe, vgl. Biochem. J. 24, 1479 (1930).

Tabelle 84. Vitamin B_2 content of vegetables as demonstrated by the curative effect of the vegetables when fed to rats which had developed dermatitis on a diet devoid of vitamin B_2 (P2L. YE)

Material tested	Dry weight g	Rat No.	Days on deficient diet	Symptoms	Cure
Water-cress	0,2	15070 ♂	42	Eyes closed, fur on face poor. No skin symptoms	Condition became worse
	0,4		49	Eyes very bad, fur very poor	Cured in 3 weeks
	0,3	7005 ♂	140	Inflamed patch on ear. Eyes slightly spectacled	Cured in 3 weeks
Lettuce	0,2	9021 ♂	82	Eyes nearly shut, spectacled. Fur poor	Further symptoms developed
	0,4		98	Skin peeling round eyes and on face, very bad state	Cured slowly
	0,3	15089 ♀	75	Eyes very bad, fur poor	No improvement
	0,4		82	Nose and face losing hair	Cured in 3 weeks
Cabbage, white	0,4	12043 ♂	98	Eyes nearly shut, fur on face poor. No skin symptoms	Eyes cured
	0,3	18097 ♂	63	Skin of one finger on each hand affected. Fur poor	No improvement
	0,5		75	Symptoms as before and losing hair round mouth	Cured in 3 weeks
Spinach	0,2	14061 ♀	123	Eyes spectacled. No skin symptoms	Eyes cured in 3 weeks
	0,2	26157 ♂	105	Sores on abdomen. Fur poor	No cure in 3 weeks
Onion	0,5	15078 ♂	114	Right eye very bad. Coat poor with bald patches, but no inflammation	Eye cured and coat improved but was still not normal
	0,5	24143 ♂	156	Sore patches on head and back. General conditions very bad	General condition became worse. Symptoms the same
	0,8		165	Symptoms as before	Symptoms stationary. General conditions very bad. No cure

War die verabreichte Substanz wirksam, so tritt gewöhnlich schon nach wenigen Tagen eine Besserung im Zustand des Tieres ein, volle Heilung erfolgt etwa in 2—3 Wochen.

Tabelle 85. The curative effect of various substances on the dermatitis and other symptoms developping in rats on a vitamin B_2-deficient diet (P2L)

Rat	Condition before test	Substance tested	Lenght of time substance was fed	Result
771 ♀	Ophthalmia. Wretched condition. Weight stationary	Cheddar cheese 1 g. daily	3 weeks	Very slight improvement; 9 g. increase in wt.
714 ♂	Severe ophthalmia. Wretched condition. Dermatitis of extremities. Growth stationary	Cheddar cheese 2 g. daily	3 weeks	All lesions healed; 28 g. increase in wt.

Rat	Condition before test	Substance tested	Lenght of time substance was fed	Result
711 ♀	Poor general condition. Dermatitis of axillae, groins and feet. Cessation of growth	Fresh meat 0,4 g. daily (0,1 g. dry wt.)	2 weeks	Improvement in dermatitis; 5 g. increase in wt.
734 ♀	Severe dermatitis of axillae and groins. Poor general condition. Cessation of growth, loss of weight	Cooked liver 0,4 g. daily (0,12 g. dry wt.)	3 weeks	Complete cure; 37 g. increase in wt.
3061 ♂	Severe dermatitis of fore-paws. Ophthalmia. Nose inflamed. Haematuria. Cessation of growth	Wheat germ 7½ %	1 week	No improvement or resumption of growth
		Wheat germ 15 %	1 week	Ditto
		Wheat bran 15 %	1 week	Ditto
		P_2L + 1,0 cc. yeast fraction ≡ 5 g. dry yeast	2 weeks	Complete cure; 28 g. increase in wt.
3067 ♂	Dermatitis of fore-paws. Inflamed nose. Haematuria. Cessation of growth	Patent flour 65 %	5 days	Died
378 ♂	Severe ophthalmia. Diarrhoea. Cessation of growth	Patent flour 65 %	3 weeks	Temporary improvement, followed by regression; no growth
		P_2L + 0,4 g. autoclaved yeast	3 weeks	Complete cure; 47 g. increase in wt.
728 ♂	Dermatitis of tail and extremities. Commencing gangrene of two toes. Cessation of growth	Maize germ meal 60 %	3 weeks	Toes sloughed off and all dermatitis healed; 30 g. increase in wt.
748 ♂	Severe dermatitis of fore-paws and feet. Commencing gangrene of toes. Dermatitis of tail. Weight stationary	Maize germ meal 60 %	3 weeks	Complete cure of dermatitis; toes sloughed off and stumps practically healed; 31 g. increase in wt.
729 ♂	Severe dermatitis of fore-paws. Weight stationary	Milk 6 cc. daily	3 weeks	All lesions healed; 38 g. increase in wt.
802 ♂	Great wasting. Dermatitis of axillae and groins, spreading down inside of thighs and forelimbs. Large raw area on abdomen	Egg-white 5 g.	3 weeks	Complete cure of all lesions; 31 g. increase in wt.
3075 ♀	Ophthalmia. Slight dermatitis of fore-paws. Cessation of growth	Egg-white 60 % of diet	3 weeks	Complete cure; 42 g. increase in wt.
757 ♀	Ophthalmia, very poor condition. Severe dermatitis of groins and axillae. Haematuria. Loss of weight	Egg-white extract (≡ 5 g. fresh egg-white)	4 weeks	Complete cure of all symptoms; 26 g. increase in wt.

Auch Hefe gibt, wie aus folgender Tabelle nach Chick-Copping 8), 9) hervorgeht, bei der Auswertung nach dieser Methode gute Werte.

Es sei noch hier erwähnt, daß die Dosen an Vitamin B_2, die zur Heilung der Xerophthalmie erforderlich sind, etwa $^1/_2$—$^1/_3$ derjenigen Dosis betragen, die eine Gewichtszunahme im Gewichtstest von 50—60 g in 4 Wochen hervorruft.

Tabelle 86. Heat-stability of vitamin B_2 in yeast extract (XXIV). Autoclaved at 119° for 4 hours. Curative tests. Vitamin B_1 provided as Peters's concentrate

p_H of extract when heated	Dose, expressed as equivalent of dry yeast g.	Rat no. and sex	Time on "—B_2" diet. Weeks	Symptoms: general condition	Body weight g.	Average weekly increase in body weight during treatment g.	Result of treatment
2,5	0,5	574♀	16	Eyes badly affected, bloody discharge from nose and eyes. Fur very poor on chest	72	16	Rapid cure. 1st week, eyes and skin became healthy and new fur began. Skin and eyes normal in 2½ weeks
2,5	0,5	624♀	12	Skin symptoms severe. Eyes sunken, secreting, "spectacled." Bloody discharge also from nose. Fur very poor, thin and "stringy" over face and neck. Abdomen stained	47	14	Rapid cure. 1st week. Eyes nearly normal, posture also. 2nd week. All symptoms disappeared. 3rd week. Normal fur
2,5	0,5	645♀	6	Skin symptoms slight but animal very weak and apparantly moribund. Abdomen stained	42	21	Rapid cure. Coat appeared normal in 9 days
2,5	0,33	589♀	16	Skin symptoms severe. Eyes "spectacled"; left nearly closed. Fur poor and stringy on face and neck. Bloody discharge from nose and eyes. Abdomen stained	66	9	Slow cure. Eyes improved and stains on fur from discharges disappeared in 3 weeks. New fur growing and coat becoming normal in 4½ weeks
2,5	0,16	604♀	12	Eyes "spectacled." Paws blood-stained. Fur poor and "stringy" over face and neck. Abdomen stained. Condition miserable	55	6	Very slow cure. Symptoms arrested in 1st week. Stains on abdomen disappeared in 3rd week, skin and eyes not normal after 4 weeks
2,5	0,16	564♀	21	Skin symptoms severe. Eyes "spectacled," nostrils inflamed, bloody discharge. Fur "stringy," bald patches round ears, raw patches round anus and vagina. Abdomen stained. Condition miserable	50	7	Marked improvement in 1 week, ears and forepaws desquamating. Skin round vagina dry and healthy

8) Chick-Copping, Biochemic. J. 24, 932 (1930).
9) Chick, Biochemic. J. 27, 1533, 1537 (1933).

pH of extract when headet	Dose, expressed as equivalent of dry yeast g.	Rat no. and sex	Time on "—B," diet. Weeks	Symptoms: general condition	Body weight g.	Average weekly increase in body weight during treatment g.	Result of treatment
10,3-9,6	1,0	599♂	17	Symptoms slight. Eyes sunken, "spectacled." Bloody discharge from nose. Fur thin on face. Abdomen stained	81	Lost 10 g. in 23 days	No cure. Symptoms became worse in 2-3 weeks. Bare, raw, desquamating patches developed round eyes and on left side of neck and shoulder. Skin round nose and lips became swollen and cracked, area of inflamed skin developed round anus. Animal very miserable. Killed
10,3-9,6	1,0	635♂	10	Skin symptoms severe. Eyes sunken, "spectacled." Bloody discharge from nose. Fur "stringy", bald patches round ears. Nose tip inflamed	49	2,5	No cure. Condition remained almost unchanged except for dionset of arrhoea during 5 weeks' treatment. Treated with Dr. Readers' preparation of marmite. Marked improvement in 1 week. In 3 weeks coat almost normal, animal in normal health, increase in weight 72 g.
10,3-9,6	0,5 later 1,0	565♂	15	Skin symptoms not severe. Eyes sunken and inflamed Bloody discharge from nose. Diarrhoea	88	Lost 15 g. in 22 days	No cure. Condition became worse. In 3 weeks raw, bald patches were spreading from the axillae down the forearms. Mouth sore and inflamed. Condition of animal miserable. Treated with acid-autoclaved material equivalent to 0,5 g. yeast. Rapid cure. In 10 days nose healing; new fur growing every where, increase in weight 27 g.
10,3-9,6	0,5	616♂	13	Skin symptoms slight and incipient. General condition fair	56	Lost 9 g. in 27 days	No cure. Condition rapidly grew worse. In 3 weeks inflamed, bare patch of skin developed under chin, nostrils inflamed, fur "stringy." Treated with Dr. Reader's preparation of marmite. Marked improvement in 1st week, in 3 weeks nostrils healed, coat almost normal; increase in weight 56 g.

Tabelle 87. Daily doses of various materials needed by young rats when given as sole source of vitamin B_2, in order to: (1) promote 50—60 g. weight increase in 5 weeks; (2) cure the dermatitis developing in the absence of vitamin B_2 10)

Material	Daily dose g. *) required for 50—60 g. wt. incr. in 5 weeks	Daily dose g. *) given to cure dermatitis	No. of rats: Cured	No. of rats: Slight improvement	No. of rats: No improvement	Smallest dose on which more than ½ of the rats were cured, g.	Ratio of growth-promoting to dermatitis-curing doses
	(a)					(b)	(a/b)
Yeast extract							
R. VIII	0,25	0,06	—	1	—	0,125	2,0
		0,125	2				
R. X	0,25	0,06	—	1	3	0,125	2,0
		0,125	3				
R. XII	<0,25	0,06	2	—	1	0,06	<4,0
		0,125	1				
Acid autoclaved yeast extract (120°, 5 hours)							
R. V	0,25	0,06	—	1	—	0,125	2,0
		0,125	3	—	1		
		0,25	1				
R. X	0,25	0,06	2	1	2	0,125	2,0
		0,125	3	—	1		
Alkaline autoclaved yeast extract (120°, 1 hour)							
R. VIII	1,5	0,25	1	—	1	0,5	3,0
		0,5	1				
R. X	0,5	0,125	—	1	1	0,25	2,0
		0,25	3	1			
		0,5					
R. XII	1,0	0,125	—	—	1	0,25	4,0
		0,25	2				
Egg-white filtrate							
R. I	10	1,25	—	—	1	2,5	4,0
		2,5	2				
Meat							
Steak, dry	0,7	0,1	—	1	3	0,2	3,5
		0,2	2	—	1		

III. Vorkommen und Natur des Vitamins B_6

Das Vitamin B_6 findet sich in den nach Kinnersley und Mitarbeitern aus der Kohleadsorption der Hefeextrakte hergestellten Eluaten neben B_1 und B_4. Es ist nicht mit dem B_4 identisch, da auch bei alkalischer Temperatur autoklavierte Lösungen wirksam sind (das B_4 wird dabei zerstört). Das Vitamin B_6 kann identisch sein mit dem Faktor von Chick und Copping oder mit dem Vitamin B_5. Es fehlt im Hühnereiweiß.

*) The doses of extracts are given as the equivalents in dry yeast, those of the egg-white filtrate as equivalents of fresh egg-white.

10) Roscoe, Biochemic. J. 27, 1533, 1537, 1540 (1933).

Der „extrinsic factor“ – Das Anti-Sprue-Vitamin (?)

Der dritte Faktor des Vitamin B_2-Komplexes ist vermutlich der „extrinsic factor“ von Castle. Schon früher waren bei der experimentellen B_2-(Komplex-)Avitaminose Magen-Darmstörungen und Veränderungen im Blutbild beobachtet worden, die aber nie gesetzmäßig auftraten und meist als Folgeerscheinungen des längerdauernden B_2-Entzugs galten. Sie haben, wie wir heute wissen, mit dem Vitamin B_2 (Flavin) nichts zu tun, sondern sind eher die Folgeerscheinung des Mangels an „extrinsic factor“.

I. Die klinischen Erscheinungen des Mangels an extrinsic factor

1. Sprue und Perniziosa

Obgleich die Untersuchungen von Castle 1), der den extrinsic factor allgemein mit dem Vitamin B_2 identifizierte, erst in letzter Zeit dazu geführt haben, die Substanz als selbständiges Vitamin aufzufassen, kennen wir schon seit langem zwei scharf umrissene Krankheitsbilder, die zum extrinsic factor Beziehungen aufweisen, nämlich die Sprue und die perniziöse Anämie. Ihre Hauptsymptome sind:

Tropische Sprue	Perniziosa
1. Glossitis, meist zu Beginn der Erkrankung mit kleinen hyperämischen Herden, dann grauer, grauweißer Belag. Atrophie mit Papillenschwund, „Firnißzunge“	1. Magenstörungen, Sub-Anazidität
2. Magen-Darmstörungen. Meist Subazidität. Stark schäumende, blasse, grauweiße Stühle; stark fetthaltig, „Butterstühle“, weder Blut, noch Eiter, noch typische Mikroorganismen, abnorm starke Gärungsvorgänge im Darm, Darm atrophisch, papierdünn, durch Gas zum Platzen gebläht.	2. Blutveränderungen, schwere Anämie mit Remissionen, Retikulozytenkrisen. Hyperchromes Blutbild, Leukopenie.
3. Blutveränderungen, schwere Anämie vom Perniziosatyp, Leukopenie, Hypersegmentation der Neutrophilen.	3. Neurologische Erscheinungen
4. Nervöse Erscheinungen, Muskelkrämpfe, Tetanie.	

Die Zusammenhänge zwischen Sprue und Perniziosa sind in den letzten Jahren durch die bemerkenswerten Arbeiten von Castle (l. c. 1) aufgedeckt. Nach Castle beruhen alle Anämien vom Perniziosatyp (also auch die Anämie bei Sprue und echter Perniziosa) auf dem Fehlen einer normalerweise im Magen vor sich gehenden Reaktion zwischen einer von der Magenschleimhaut sezernierten Substanz (intrinsic factor) und einem mit der Nahrung zugeführten

1) Castle c. s., J. amer. med. Assoc. 98, 1620 (1932); 92, 1830 (1929); 96, 1198 (1931); Amer. J. Med. Sci. 1929, 748, 764; 1930, 305; 1931, 741; 1932, 653, 663; 1933, 539; New England J. Med. 202, 523 (1930); J. Clin. Invest. 11, 1293 (1932).

Stoff (extrinsic factor). Aus beiden entsteht eine Substanz, die die Aufgabe hat, die normale Erythropoese zu steuern, und die in der Leber gespeichert wird (Perniziosaschutzstoff der Leber):

extrinsic factor + intrinsic factor = Perniziosaschutzstoff.
(Vitamin) (Ferment)

Während der intrinsic factor Fermentnatur besitzt, ist der extrinsic factor was Stabilität, Vorkommen usw. anlangt, ein Bestandteil des Vitamin B_2-Komplexes. Er ist mit dem Vitamin B_2 (Flavin) nicht identisch (Diehl c. s. 2)) und wahrscheinlich auch vom Vitamin B_6 verschieden.

Nach den Vorstellungen von Castle müssen wir logischerweise mindestens zwei Formen der perniziösen Anämie unterscheiden:

1. Eine solche, die durch das Fehlen des intrinsic factors, also des Magenfaktors, entsteht, wie die Perniziosa des Erwachsenen.
2. Eine solche, die durch Fehlen des Nahrungsfaktors, des extrensic factors, entsteht, wie die Anämie bei Sprue, die eine Avitaminose ist.
3. Kommt nach Castle noch eine weitere Form dazu, bei der die Reaktion im Verdauungstrakt sich normal vollziehen kann, bei der aber der entstehende Perniziosaschutzstoff durch besondere Magen-Darmverhältnisse nicht resorbiert wird.

Ganz im Sinne dieser Anschauungen verläuft tatsächlich die therapeutische Beeinflussung der verschiedenen Anämieformen. Während die Anämien des ersten und zweiten Typs beide durch die fertig gebildete Substanz, also durch den Leberschutzstoff heilbar sind, ist die echte Perniziosa außerdem durch Zufuhr des fehlenden Ferments, z. B. durch Magenpräparate zu beeinflussen. Die tropischen Anämien vom Perniziosatyp heilen außerdem durch Zufuhr des fehlenden Vitamins, des extrinsic factors, z. B. durch Hefe, Fleisch usw. Die Castlesche Reaktion zwischen Ferment und Vitamin läuft auch in vitro durch Bebrütung von Fleisch, Hefe usw. mit Magensaft ab.

2. Die experimentelle „Rattensprue“

Entsprechend den Castleschen Vorstellungen ist es beim Tier durch diätetische Beeinflussung nie gelungen, eine echte Perniziosa zu erzeugen. Wohl war es möglich, durch verschiedene Gifte die Blutbildung so umzugestalten, daß perniziosaähnliche Bilder enstanden. Sie waren aber nie spezifisch durch Leber und Leberextrakte zu beeinflussen. Dagegen konnten Rominger und Bomskov 3) kürzlich am Tier ein Krankheitsbild erzeugen, dessen Hauptsymptome denen der tropischen Sprue am nächsten kommen. Vor allem zeigt sich hinsichtlich der Therapie, daß nicht nur Leberextrakte die Erkrankung verhüten und heilen, sondern auch Zufuhr des fehlenden Nahrungsfaktors sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch wirksam ist.

Füttert man ganz junge, wachsende Ratten im Alter von 21 Tagen, mit einem Gewicht von etwa 27 g, ausschließlich mit einer hochwertigen reinen Ziegenmilch, so zeigen die Tiere sehr bald Durchfallserscheinungen. Diese Durchfälle unterscheiden sich aber von denen bei Kuhmilchfütterung und anderen Nahrungen, indem sie in den ersten Tagen eine schaumig-flüssige Beschaffenheit zeigen, um dann

---

2) Diehl c. s., Dtsch. Arch. klin. Med. 176, 151 (1933).
3) Rominger-Bomskov, Z. exper. Med. 1933, 1.—4. Mitteilung.

nach einiger Zeit in mehr oder minder geformte breiige Exkremente überzugehen. Dabei ist typisch, daß der Fäkalgeruch schwindet und die Stühle schon äußerlich eine mattglänzende lehmartige Beschaffenheit nach Art von Butterstühlen annehmen. Die mikroskopische Untersuchung ergibt massenhaft Fettsäurenadeln und reichlich Fett in Tropfenform. Die chemische Untersuchung zeigt einen Fettgehalt bis zu 50 % der Trockensubstanz. Diese Stühle bleiben, falls die Tiere nicht geheilt werden, bis zum Tode bestehen. Es finden sich weder Blut, noch Eiterbeimengungen, noch ließen sich pathogene Mikroorganismen, wie Würmer, Protozoen oder Monilien, nachweisen.

Außerdem zeigt sich nach etwa 14tägiger Fütterung der Ziegenmilch eine starke Aufblähung der Bäuche (Kugelbauch), die ihre Ursache in einer abnorm starken Darmgärung hat.

Auffällig ist bei den Ratten, daß sie, nachdem sie anfänglich die Milch gierig aufnehmen, nach 1 Woche scheinbar Schwierigkeiten beim Trinken haben. Sie versuchen mit den Vorderpfoten Milch aus den Näpfen zu schöpfen und lecken die mit Milch benetzte Pfote ab (Zungenveränderungen ?).

Während sich die beschriebenen Krankheitszeichen entwickeln, machen die Ratten einen schwerkranken Eindruck und die vorgenommene Blutuntersuchung ergibt eine Anämie vom Perniziosatyp. Die Zahl der Erythrozyten ist bis auf 1 Million und weniger gesunken, die Hämoglobinwerte sind nicht ganz entsprechend vermindert, so daß der Färbeindex erhöht ist. Die Differenzierung des Blutbildes ergibt eine relative Vermehrung der Lymphozyten und eine Abnahme der Neutrophilen. Charakteristisch ist die abnorm starke Segmentierung der letzteren. Das rote Blutbild zeigt Anisozytose, Poikilozytose und Polychromasie; Megaloblasten und Normoblasten treten zahlreich auf. Die Retikulozyten zeigen nach anfänglicher Erhöhung bei fortschreitender schwerer Anämie eine Abnahme auf 4—5 %. Es besteht eine ausgeprägte Leukopenie. Das Blut ist kakaofarben und das Serum erweist sich nach dem Sedimentieren als reichlich fetthaltig.

Während der Entwicklung dieser Erscheinungen nehmen die Tiere nicht wie die Kontrolltiere zu (2,2 g pro die bei gesunden und 0,5 g pro die bei gleichalten anämischen Ratten während der Zeit vom 21. bis zum 41. Tage). In einzelnen Fällen fortgesetzter Ziegenmilchfütterung treten auch nervöse Symptome auf, unter denen zunächst Muskelschwäche, dann eigentümliche Steifheit der Glieder und schließlich Lähmungen auffallen. Bei der Sektion erweisen sich die Därme papierdünn und durch Gas zum Platzen gebläht. Der Dünndarminhalt ist hellgelblich, flüssig. Entzündungserscheinungen sind makroskopisch nicht wahrzunehmen. Die Leber ist klein, atrophisch und zeigt hellgelbe Verfärbung nach Art der Fettleber. Der Mageninhalt stellt meist eine fast feste, knetbare Masse dar, die nach Befeuchten nur in einigen Fällen sauer reagiert (Kongo). Auf der Höhe der Krankheitserscheinungen ist im Blut eine starke Lipämie nachweisbar. Der Blutzucker ist um etwa 50 % gesenkt. Die Untersuchung des Leberglykogens ergibt kaum meßbare Werte. Im Harn ist der Urobilingehalt während der Dauer der Erkrankung erhöht.

Spritzt man den Tieren nach voller Entwicklung des Krankheitsbildes Leberextrakt, so tritt nach einer typischen Retikulozytenkrise (Retikulozytenwerte von 50—60 %!), eine Erhöhung der Erythrozytenwerte ein, die von einem Anstieg des Gewichts und einer Besserung im Allgemeinzustand begleitet ist. Dabei ist bemerkenswert, daß die Hgb.-Werte nur wenig ansteigen, da die Ziegenmilch ja eine fast eisenfreie Nahrung ist. Erst Zufuhr von Leber + Eisen heilt die Anämie vollständig, genau wie auch bei der tropischen Sprue. In derselben Weise gelingt es, die Anämie durch Zugabe von kleinsten Mengen einer Substanz zu heilen, die in Hefe, Fleisch, Fleichextrakt enthalten ist. Es handelt sich hier offenbar um denselben Faktor, der bei der Entstehung der tropischen Sprue eine Rolle spielt und den Castle mit extrinsic factor bezeichnet.

Wir fanden keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß das beschriebene Krankheitsbild auf einer Unterwertigkeit des verfütterten Caseins oder des Fetts oder auf Mangel an den Vitaminen A, C oder B_2 (Flavin) beruht. (Hinsichtlich B_2 vgl. Diehl und Kühnau (l. c. 2).)

3. Sprue-artige Erkrankung anderer Tiere

Nach den Untersuchungen von Goldberger erkranken Hunde in Pellagragegenden auf einer pellagraerzeugenden Kost an nekrotisierenden Veränderungen, Entzündungen und Pigmentationen am Pharynx und Ösophagus, die zu der charakteristischen „black tongue“ führen. Die Entstehung des Krankheitsbildes zeigt auch Beziehungen zum Vitamin A.

Neuerdings konnten Miller-Rhoads 4) bei Hunden auf einer black tongue erzeugenden Diät Sprue hervorrufen (gastrointestinale Störungen, Stomatitis, Diarrhöen, Erbrechen, Gewichtsabnahme, perniziöse Anämie). Die Anämie war durch Leber nicht beeinflußbar und heilte nur durch Zufuhr von Hefe. Die Kostmischung, die von den Autoren benutzt wurde, bestand aus: 4000 g weißem Roggenmehl, 500 g Erbsen, 500 g Casein, rein, 300 g Zucker, 300 g Baumwollsamenöl, 200 g Lebertran, 50 g Salzgemisch und 400 g Reishäutchen.

II. Versuchstechnik

Die experimentelle „Rattensprue“ könnte in zweierlei Hinsicht für eine biologische Auswertung in Frage kommen, nämlich erstens für die Auswertung des extrinsic factors und zweitens für die Auswertung des Perniziosaschutzstoffs der Leber. Bisher scheiterte eine solche an der individuell verschiedenen Reaktionsfähigkeit der Tiere sowie an dem Umstand, daß während des Durchfallstadiums viele Tiere vor Entwicklung der Anämie eingehen. Die Versuchstechnik ist folgende:

Versuchstiere und ihre Haltung: In den Versuch kommen junge Ratten im Alter von 21 Tagen mit einem Gewicht von 27 $\pm$ 3 g, die von der Mutter entfernt und ausschließlich mit Ziegenmilch (roh) gefüttert werden. Tiere aus kleinen Würfen (4—5) sind zu resistent. Man nimmt am besten die Ratten nur aus Würfen mit 6—10 Tieren.

Die Ratten werden in den beschriebenen Drahtkäfigen zu zweien gehalten. Die Käfige werden mit wenig Holzwolle (täglich zu erneuern) versehen, da die anämischen Tiere gegen Temperaturschwankungen außerordentlich empfindlich sind. Die Ziegenmilch wird täglich frisch in kleinen Näpfen verabreicht, die mit heißem Wasser gesäubert werden. Die Tiere werden zweimal wöchentlich gewogen.

Haltung der Zuchttiere: Von größter Bedeutung ist die Haltung der Zuchttiere. Wir brauchen durchweg rein weiße Tiere, die mit einer Kost aus Weizen ad libitum, Mais ad libitum, frischer Vollmilch ad libitum und geröstetem Weißbrot sowie Gemüse (2 mal wöchentlich Karotten oder Kohl und Rüben) ernährt werden. Die Muttertiere müssen mindestens 6 Monate lang auf dieser Diät leben, bevor die Jungen brauchbar sind. Auch durch möglichst schnell aufeinanderfolgende Geburten gelingt es bei manchen Rassen, die sich sonst resistent erweisen, eine schwere Anämie bei den Jungen zu erzeugen.

Fütterung der Tiere: Die Versuchstiere erhalten ausschließlich Ziegenmilch. Die Milch muß hochwertig sein. Wir benutzen die Mischmilch von 3—4 Ziegen, die im Stall gehalten werden. Die Ziegen werden mit Schrot, Heu und Küchenabfällen wie Erbsenschoten, Kohl usw., Kastanienblättern, Hopfenranken, Falläpfel, im Winter mit Kohl und Rüben gefüttert. Sie werden morgens und abends gemolken. Die Milch ist fettreich.

---

4) Miller-Rhoads, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 540 (1933); J. of exper. Med. 58, 585 (1933).

III. Vorkommen des extrinsic factors

Ob der extrinsic factor in der Ziegenmilch fehlt oder ob diese Kost nur eine so ungünstige Kombination von Fett-Eiweiß und Kohlenhydraten usw. darstellt, daß darauf der Bedarf ein gesteigerter ist, oder ob infolge der Durchfälle vielleicht eine Resorptionsstörung vorliegt, läßt sich nicht entscheiden. Der extrinsic factor fehlt jedenfalls in Weizenkleie, gereinigtem Casein, gereinigtem Nukleoprotein. Er ist in Fleisch, Malz- und Leberextrakten vorhanden. Hefe enthält 20mal mehr extrinsic factor als Fleisch.

Der extrinsic factor ist löslich in 80%igem Alkohol. Er ist gegen Erhitzen stabil und verträgt selbst Autoklavieren.

IV. Die Reaktion zwischen extrinsic und intrinsic factor in vitro

Die Reaktion zwischen Magenfaktor und Vitamin läuft in vitro durch Bebrütung von Fleisch mit Magensaft ab. Gesunde Individuen erhalten 0,5 mg Histaminphosphat subkutan. Während der folgenden Stunde wird der Magensaft gesammelt. Man filtriert ihn durch Gaze. Dann werden 200 g Fleisch (ohne Fett) fein gemahlen und mit 150—300 g des Magensafts (von nüchternen Patienten) gemischt und auf 37,5^0 gebracht (Wasserbad). Man gibt vorher Salzsäure zu (5—10 ccm einer $^2/_3$-konzentrierten Lösung), bis der p_H etwa 2,5—3,5 beträgt (orange gegen Töpfers Reagens). Die Mischung wird in einer verschlossenen Flasche 2 Stunden im Wasserbad gehalten. Man schüttelt öfter und setzt nach und nach etwas Salzsäure zu. Man filtriert zuletzt durch Gaze und gibt Natronlauge bis zum $p_H = 5$ zu. Die Lösung wird direkt verfüttert.

V. Vorkommen des Vitamin B_2-Komplexes

In folgender Tabelle ist die Akroyd-Roscoe-Einheit diejenige Menge, die im kurativen Wachstumstest während einer Versuchsdauer von 5 Wochen eine Gewichtszunahme von 11—14 g pro Woche verursacht. Die Sherman-Bourquin-Einheit erzeugt unter denselben Bedingungen eine wöchentliche Gewichtszunahme von 3 g. Im allgemeinen ist die Sherman-Einheit 3mal kleiner als die Akroydsche.

Tabelle 88

Substanz	Akroyd-Roscoe-Einheit pro Gramm	Sherman-Bourquin-Einheit pro Gramm	Pellagra-verhütende Wirkung beim Menschen	Black-tongue-verhütende Wirkung beim Hund
Fleisch	0,5—0,33	1,0		50 g Protein auf 2400 Cal.
Fleisch, getrocknet	2,0—1,3			
Niere, frisch		2,5—5,0		
Herzmuskel, frisch	5,0	1—2		
Milz	3,0	0,3—0,5		
Thymus		0,4		
Gehirn	2,5			
Blut	0,75			
Leber	7—10			43,5 g auf 2400 Cal.

Substanz	Akroyd-Roscoe-Einheit pro Gramm	Sherman-Bourquin-Einheit pro Gramm	Pellagra-verhütende Wirkung beim Menschen	Black-tongue-verhütende Wirkung beim Hund
Eigelb, gekocht	0,5—1,0			12 Eier auf 2400 Cal., nicht voll genügend
Eigelb, getrocknet	1—2			
Milch	0,2—0,3	0,1—0,2		
Vollmilchtrockenpulver	1,4—2,7			
Magermilchtrockenpulver		3—5		
Trockenleber	8,4—16,6			
Magermilch			20 ccm p. d.	30 ccm/kg nicht ganz wirksam
Ziegenmilch		0,3—0,5		
Preßhefe	2,0	1—2		
Hefe, trocken	5—10	10—15	stark wirks.	11 g pro die
Hefe, autoklaviert	2,5			
Wasserkresse	0,2—0,4			
Lattich	0,13			
Kohl, weiße Blätter	0,1—0,2			
Kohl, grüne Blätter	0,2			
Spinat	0,3			
Tomatensaft		0,16		30 ccm pro die
Wasserkresse, trocken	2,5—5,0			
Lattich, trocken	1,6			
Kohl, weiß, trocken	1,2—2,5			
Kohl, grün, trocken	2,5			
Spinat, trocken	2,5			
Weizen		1,5		
Mais		1,5		
Kleie		3—4,5		
Weizenkeime		3—4,5		

Das Vitamin B_3 [1), 2), 3)]

I. Die Avitaminose B_3

Das Vitamin B_3 ist ein thermolabiler Taubenfaktor, der von den Franzosen „Vitamin d'utilisation nutritive", von den Amerikanern „nutritional Vitamin" genannt wird.

Tauben auf einer B_1-freien Kost entwickeln Polyneuritis mit Gewichtsabnahme. Heilt man die Polyneuritis durch Zugabe eines B_1-Konzentrats, so bessert sich das Gewicht nicht. Gibt man statt dessen Hefe, so tritt gleichzeitig mit Verschwinden der Krämpfe eine Gewichtszunahme ein, die durch Zufuhr

1) Williams-Waterman, J. of biol. Chem. 78, 311 (1928).

2) Eddy-Gurin-Kerestescy, J. of biol. Chem. 87, 729 (1930).

3) Randoin-Lecoqu c. s., J. of biol. Chem. 91, 671 (1931); C. r. Acad. Sci. Paris 182, 1408 (1926); 187, 60 (1928); Bull. Soc. Chim. biol. Paris 9, 513 (1927); 11, 745 (1929); 9, 49 (1927); C. r. Soc. Biol. Paris 99, 47 (1928); 99, 148, 586 (1928); 101, 11 (1929); These Paris 1928; Bull. Soc. thérap. 31, 197 (1926); Les aliments et la vie. Paris 1929.

eines in der Hefe enthaltenen Faktors, des Vitamins B_3, verursacht ist. Der Gewichtsstillstand, der durch Mangel an Vitamin B_3 hervorgerufen wird, ist nur das erste Zeichen einer Allgemeinerkrankung, die mit Mattigkeit, Bewegungsunlust und schweren Herzstörungen (Arrhythmie, Ventrikelautomatie, Herzblock) verläuft.

Das Vitamin B_3 wird nur von Tauben und Kücken benötigt, von Ratten nicht.

II. Die biologische Auswertung des Vitamins B_3

Als Versuchstiere dienen ausgewachsene Tauben. Sie werden durch Fütterung mit poliertem Reis oder einer anderen B-freien Kostform polyneuritisch. Dann gibt man ein Vitamin B_1-Konzentrat hinzu (10—14 Tage

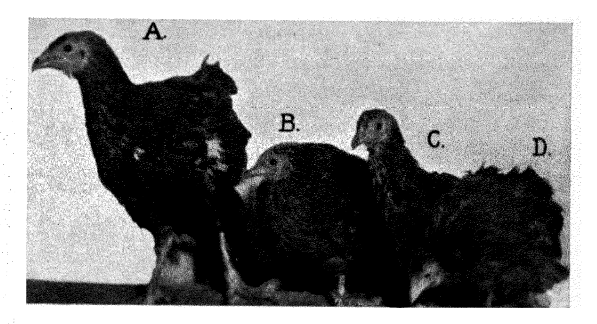


Abb. 82. Erscheinungen des B_3-Mangels bei Kücken.
A. = Kontrolltier, B., C., D. = B_3-frei ernährt. (Nach Eddy.)

lang). Die Krämpfe verschwinden danach. Selbst bei Zufuhr der 20fachen, zur Heilung nötigen B_1-Menge bessert sich aber das Gewicht nicht. Die Tiere werden täglich gewogen, dann die zu prüfende Substanz zugelegt. Enthält sie Vitamin B_3, tritt sofort Gewichtszunahme auf, die je nach der Dosis gestaffelt ist.

Man kann auch wachsende Kücken mit einer durch Autoklavieren B_1-frei erhaltenen Kost ernähren. Sie zeigen dann schlechtes Wachstum (Abb. 82), selbst nach Zugabe von B_1 und B_2. Erst auf B_3-Zulage tritt Wachstum auf. Kücken ernährt man am besten mit einer Kost aus Mais, Hafer, Tran und Austernschalen. Die Kost wird vor der Fütterung autoklaviert. B_1 legt man in Form eines Konzentrats, B_2 in Form autoklavierter Hefe zu.

III. Vorkommen und Eigenschaften des Vitamins B_3

Das Vitamin B_3 kommt reichlich in Hefe, Roggen, Gerste, Weizen und Malzextrakt vor. Muskel, Leber und Weizenkleie enthalten nur geringe Mengen. Milch ist B_3-arm.

Das Vitamin B_3 ist wasserlöslich und außerordentlich thermolabil. Schon die Erhitzung auf 60^0 zerstört vollkommen, während B_1 bei dieser Temperatur erhalten bleibt. Das Vitamin B_3 ist nur schwer an Fullererde adsorbierbar. Es ist außerordentlich alkalilabil.

Das Vitamin B_4 1)

Das Vitamin B_4 (früher von einigen Autoren B_3 genannt!) ist ein thermolabiler Rattenfaktor. Die Notwendigkeit, einen solchen neben den bereits bekannten Vitaminen anzunehmen, ergab sich aus Beobachtungen an Ratten. Es zeigte sich nämlich, daß gewisse Erscheinungen, die man früher auf Vitamin B_1-Mangel zurückführte, durch Zugabe von B_1 nicht zum Verschwinden gebracht werden konnten. Andererseits konnte gezeigt werden, daß Ratten auf einer künstlichen Diät, die alle bekannten Vitamine in schon gereinigter Form enthielt, nach einiger Zeit das Wachstum einstellen, um nach Hefezugabe erneut an Gewicht zuzunehmen.

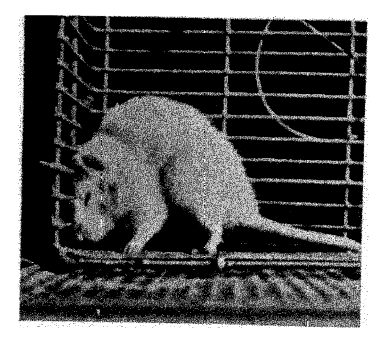


Abb. 83. Vitamin B_4-Mangel bei der Ratte. (Nach Reader.)

I. Die Erscheinungen des Vitamin B_4-Mangels

Man kann die Erscheinungen des Vitamin B_1-Mangels am besten an Ratten studieren, die zunächst B_1- und B_4-frei ernährt werden. Gibt man dann nach

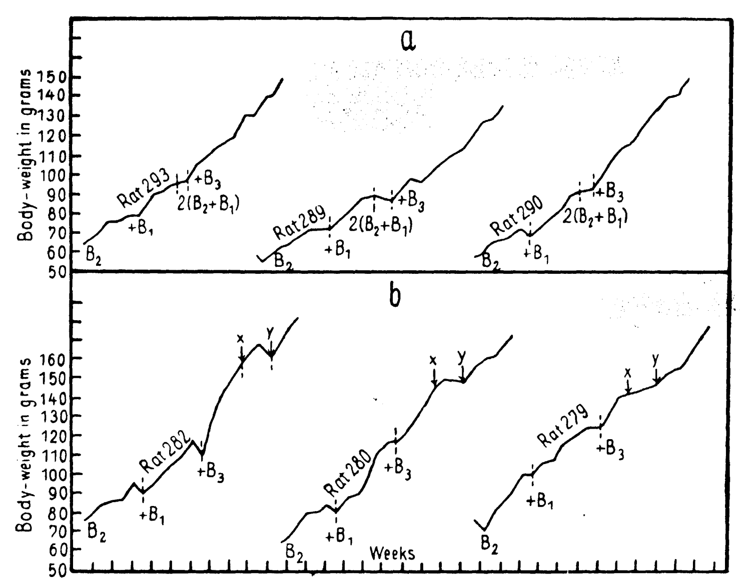


Abb. 84. Das Vitamin B_4 ist nötig, um bei Ratten auf einer B_1- und B_2-haltigen Kost Gewichtszunahme hervorzurufen.

(B_4 wird in der Abb. mit B_3 bezeichnet.) Bei x Fortnahme, bei y erneute B_4-Zugabe. (Nach Reader.)

1) Reader, Biochemic. J. 23, 689 (1929); 24, 1127, 1827 (1930).

Erscheinen der polyneuritischen Symptome das Vitamin B_1 hinzu, heilt die Avitaminose B_1 ab und es bleiben die Erscheinungen der Avitaminose B_4 bestehen. Man kann sie jederzeit durch B_4-Zulage heilen oder verhüten.

Die hauptsächlichsten Erscheinungen der B_4-Avitaminose bestehen in Muskelschwäche, Koordinationsstörungen, Ataxie, Drehbewegungen, Schwellung und Rötung der Pfoten. Die Tiere sitzen in typischer Stellung mit hochgebogenem Rücken. Sie zeigen spastischen Gang. Die Gewichtszunahme hört auf, ohne daß Gewichtsverluste eintreten. Wahrscheinlich ist auch die schwere Sinusbradykardie, die Drury und Mitarbeiter beschreiben, eine Folge des B_4-Mangels, wie überhaupt viele, der für den B_1-Mangel als spezifisch beschriebenen Symptome, auf B_4-Mangel beruhen. Die Avitaminose B_4 führt unter Kollapserscheinungen zum Tode.

Nebenstehende Abb. 83 zeigt eine typisch an Vitamin B_4-Mangel erkrankte Ratte. Aus Abb. 84 geht außerdem hervor, daß bei der B_4-Avitaminose die Zugabe der Vitamine B_1 und B_2 selbst in Dosen, die den Bedarf der Ratte bei weitem übersteigen, auf die Gewichtskurve ohne Wirkung bleibt. (In der Abbildung wird das Vitamin B_4 noch mit B_3 bezeichnet.)

II. Die biologische Auswertung des Vitamins B_4

A. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen Ratten, da das Vitamin für die Taube entbehrlich ist.

Je nachdem man den Wachstumstest benutzt oder den kurativen Test, nimmt man wachsende oder ausgewachsene Tiere. Sie müssen aus einer Zucht stammen, die mit der Kost von Reader unter Zugabe von B_1, B_2 und B_4 sowie mit allen anderen Vitaminen ernährt wurde. Die Zugabe von B_1 erfolgt in Form eines Konzentrats zu 2—3 TE. pro die. B_2 wird als autoklavierte Hefe der Kost einverleibt, B_4 in Form eines Konzentrats zugelegt.

Die Haltung der Tiere erfolgt wie bei anderen Versuchen.

B. Kostmischung

Als B_1- und B_4-freie Kostmischung dient folgende nach Reader:

Casein Glaxo, frei von Vitaminen.	20%
Reisstärke	70%
Agar-Agar	2%
McCollums Salzgemisch	5%
Lebertran	3%
Wasser ad libitum.	

Die Tiere fressen davon täglich etwa 10—15 g.

Halliday 2) hat neuerdings die Kostmischung von Sherman-Chase (s. unter B_1-freie Kostformen) mit Erfolg zum Studium des B_4-Mangels benutzt. 26—28 Tage alte Tiere erhielten die Diät, die mit caseinfreier Milch als B_2-Zulage ergänzt wurde.

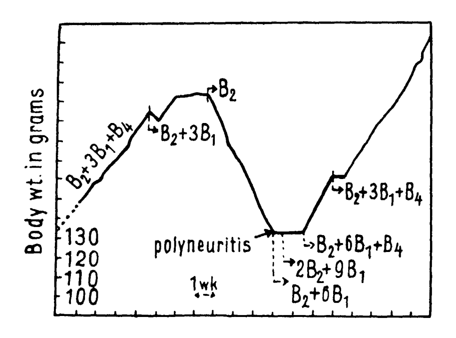
2) Halliday, J. of biol. Chem. 96, 479 (1932); 106, 29 (1934).

C. Die einzelnen Testmethoden

1. Der Wachstumstest auf Vitamin B_4

Junge Ratten, die auf der Readerschen Kost unter Zugabe aller B-Vitamine, auch des Vitamins B_4, gehalten wurden, bis sie ein Gewicht von etwa 50—60 g erreicht haben, werden weiter mit derselben Diät, aber unter Weglassung des Vitamins B_4 gefüttert, bis sie Gewichtsstillstand zeigen. Es ist auch zulässig, die Tiere zunächst völlig B-frei zu ernähren und erst dann, wenn sie aufhören zu wachsen, die Vitamine B_1 und B_2 zu verabreichen. Erst wenn die Tiere daraufhin nicht an Gewicht zunehmen, sind sie für die Auswertung brauchbar. Erfolgte schon auf Zulage der Vitamine B_1 und B_2 Gewichtsanstieg, muß mit der Zugabe der zu prüfenden Substanz gewartet werden, bis das Gewicht auch nach Verdoppelung der Dosen konstant bleibt.

Der Gewichtsstillstand tritt meist nach 2—3 Wochen ein. Eine Verdoppelung der B_1- und B_2-Dosen ist dann meist ohne Einfluß. Die Zugabe der Vitamine B_1 und B_2 ist wichtig, da nur bei Anwesenheit aller Vitamine der B-Gruppe Wachstum möglich ist.



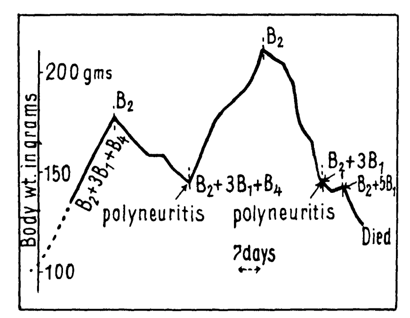


Abb. 85. Typische Kurven beim „adult curativ" Test auf Vitamin B_4. (Nach Reader.)

Die Zugabe der zu prüfenden Substanz hat getrennt vom Futter zu erfolgen. Das Gewicht muß wöchentlich 3mal kontrolliert werden. Man vergleicht dabei am besten die Wirkung der unbekannten Substanz mit einem Standard, den man sich selbst herstellt. Ein Vergleich der absoluten Zunahmen ist nur auf derselben Kost und im selben Labor zulässig. Ein Testbeispiel wurde in Abb. 84 gebracht.

2. Der „adult curativ"-Test

Man benutzt ausgewachsene Ratten, die auf obiger Diät unter Zugabe aller B-Vitamine gehalten wurden. Man vermeidet dadurch Schwankungen in der Reaktionsfähigkeit. Die Tiere erhalten weiter dieselbe Kost unter Weglassung der Vitamine B_1 und B_4, bis sie eine Polyneuritis entwickeln, was in etwa 4 Wochen bei 50% der Ratten der Fall ist. Es treten dann Konvulsionen, Ataxie, Schwäche, Rötung der Zehen und partielle Paralyse der Hinterbeine auf. Die Beriberi wird nun durch Zugabe von B_1 zur Heilung gebracht. Es bleiben die für den B_4-Mangel charakteristischen Erscheinungen bestehen.

Erfolgt in diesem Stadium keine B_4-Zufuhr, so gehen die Tiere im Laufe von 10 Tagen unter Kollapserscheinungen ein.

Füttert man rechtzeitig, also gleich nach dem Verschwinden der Polyneuritis eine B_4-haltige Substanz, so sind die Tiere schon nach 2 Tagen aktiver und nach etwa 1 Woche völlig gesund. Man bestimmt außerdem regelmäßig das Gewicht und benutzt die Gewichtszunahme als Nebenkriterium der B_4-Wirkung.

Wurde die Ratte durch die zu prüfende Substanz geheilt, so kann das Tier nochmals für den Test Verwendung finden. Man füttert dann solange B_4, bis das normale Gewicht erreicht ist, und setzt es dann wieder auf die Mangelkost. Es erscheint nun zum zweiten Male, bei etwa demselben Gewicht wie zuvor, die Polyneuritis. Reader hat mit Erfolg bis zu 4 Substanzen am selben Tier ausgewertet 3).

III. Vorkommen des Vitamins B_4

Das Vorkommen des Vitamins B_4 ist im allgemeinen eng an das des Vitamins B_1 geknüpft. B_4 findet sich reichlich in Hefe und kann hieraus getrennt vom B_1 gewonnen werden.

IV. Darstellung des Vitamins B_4

Die beiden Methoden, die wir zur Darstellung B_4-haltiger Konzentrate kennen, beruhen auf der Fällbarkeit dieser Substanz durch Merkurisulfat in saurer Lösung und zweitens auf der leichten Adsorbierbarkeit in stark saurer Lösung durch Norit. Mit beiden Methoden gelingt die vollkommene Trennung von Vitamin B_1.

1. Die Adsorption des Vitamins B_4 an Norit

Die Methode wurde bereits bei der Darstellung Vitamin B_1-haltiger Konzentrate beschrieben. Siehe Kinnersley-Peters (S. 193). Man erhält eine Substanz, die außer B_4 auch noch das Vitamin B_1 enthält.

2. Die Fällung des Vitamins B_4 durch Merkurisulfat

Die Darstellung und Fällung des Hefeextrakts mit Merkurisulfat wurde bereits bei Kinnersley (S. 192) beschrieben. Man verarbeitet den Niederschlag wie folgt weiter:

Der Niederschlag aus einer Extraktmenge, die 40 lbs entspricht (1 lbs = 453,29 g), wird gewaschen, bis die Lösung mit Bromthymolblau Blaufärbung gibt. Dann suspendiert man ihn in 6 Liter Wasser und leitet 4 Stunden lang Schwefelwasserstoff hindurch. Man filtriert ab und engt das Filtrat im Vakuum bei 40—60° ein. Das Filtrat wird mit Natronlauge auf $p_H = 3$ gebracht und auf 1 Liter konzentriert. Dann stellt man $p_H = 4{,}5$ her und versetzt die Lösung mit derselben Menge Alkohol. Man läßt 24 Stunden im Eisschrank stehen. Es wird filtriert, der Niederschlag verworfen. Das Filtrat wird im Vakuum vom Alkohol befreit und auf 400 ccm eingeengt. Man gibt Aceton bis zur Konzentration von 80% zu und läßt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Der Niederschlag wird verworfen. Das Filtrat engt man im Vakuum (Innentemperatur nie über 60°) auf 200 ccm ein, läßt 2 Tage im Eisschrank stehen und filtriert. Das Filtrat ist in Dosen von $^1/_{20}$—$^1/_{40}$ ccm wirksam. Zur Aufbewahrung wird es auf $p_H = 4$ eingestellt und mit 20% Alkohol versetzt.

---

3) Reader, Biochemic. J. 24, 1827 (1930).

3. Darstellung eines kristallisierten Präparats nach Barnes-O'Brien-Reader 4), 4a)

Nach der bei Vitamin B_1 beschriebenen Methode von Peters und Mitarbeitern (S. 193) stellt man sich aus 50 kg Hefe ein Kohleadsorbat her, das neben Vitamin B_1 auch das B_4 enthält.

Unmittelbar nach der Adsorption wird die Kohle abgesaugt und mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen ($p_H = 1$). Dann wird sie mit 50 %igem Alkohol, der genügend Salzsäure enthält, um die über der Kohle stehende Lösung auf das $p_H = 1$ zu bringen, bedeckt. 4 Extraktionen mit Alkohol (jedesmal 800 ccm) werden ausgeführt. Dabei erwärmt man auf dem Wasserbad auf 70°. Es wird heiß filtriert. Man vereinigt die gesamten Extrakte und stellt auf $p_H = 3$ (mit Natronlauge) ein. Die Lösung wird im Vakuum vom Alkohol befreit. Das Endvolumen soll 1500 ccm betragen. Die Lösung wird über Nacht im Eisschrank aufbewahrt.

Der Extrakt wird wieder auf $p_H = 3$ eingestellt und mit 350 ccm Deniges Merkurisulfatreagens versetzt. Nach einstündigem Stehen wird filtriert. Der Niederschlag wird verworfen. Das überschüssige Sulfat wird aus dem Filtrat durch Fällung mit heißer Barytlösung bis zum $p_H = 2$ entfernt. Nach weiteren 2 Stunden wird abfiltriert und das Filtrat mit Natronlauge auf $p_H = 4$ gebracht. Die Lösung wird 4 Stunden lang mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das überschüssige Gas wird im Vakuum entfernt (Temperatur nie über 30°). Die Lösung wird über Nacht kalt aufbewahrt (etwa 200 ccm). Die aktive Substanz wird im Gegensatz zu früheren Untersuchungen hier nicht durch Merkurisulfat gefällt. Die Ursache liegt darin, daß die Fällung mit dem Kohleeluat erfolgt, während früher die Fällung direkt vom Hefeextrakt ausging.

Die Lösung wird nun weiter auf $p_H = 6$ gebracht und mit 50 ccm einer 10 %igen Phosphorwolframsäurelösung (vor der Fällung werden 10 g der 1 : 24 Säure, die nach Wu 5) dargestellt wurde, in 50 ccm Wasser gelöst, mit 20 %iger Natronlauge auf $p_H = 6$ gebracht, auf 100 ccm aufgefüllt) versetzt. Dann fügt man 5 %ige Schwefelsäure hinzu, bis $p_H = 3$ erreicht ist und stellt die Lösung über Nacht in den Eisschrank. Am nächsten Tage filtriert man und verwirft den Niederschlag. Zum Filtrat gibt man Schwefelsäure bis zum $p_H = 1$. Die Lösung wird wieder 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Der Niederschlag, der die gesamte wirksame Substanz enthält, wird abfiltriert.

Der Niederschlag wird in der kleinsten Menge 50 %igem Alkohol (etwa 100 ccm) auf dem Filter gelöst (heiß) und die Lösung 24 Stunden in der Kälte aufbewahrt. Alle in heißem Alkohol unlöslichen Stoffe werden verworfen.

Am nächsten Tage wird der gelbe Niederschlag, der gewöhnlich kristallin ist, abfiltriert und in 50 %igem Aceton gelöst. Die Lösung wird mit kalt gesättigter Barytlösung versetzt (bis zum Umschlag von Phenolphthalein). Man schüttelt noch 5 Minuten und filtriert so schnell als möglich ab. Die Lösung wird mit Schwefelsäure angesäuert ($p_H = 3$). Das Filtrat des Bariumsulfats (etwa 250 ccm), das 30—40 % Aceton enthält, hat im Kubikzentimeter etwa 10—15 Ratteneinheiten („adult curativ"-test).

Die Lösung wird im Vakuum von Aceton befreit, auf 50 ccm eingeengt. Man gibt 5 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu und erhitzt auf dem Wasserbad für 1 bis 2 Stunden, bis eine positive Pentose-Orcinol-Reaktion erreicht ist. Meist genügt einstündiges Erhitzen.

Man engt auf dem Wasserbad auf 10 ccm ein und versetzt mit 20 ccm Aceton. (Etwa entstehender Niederschlag wird verworfen.) Die Lösung wird mit 70 ccm Äther versetzt und nach gutem Umrühren in Eis 12 Stunden aufbewahrt. Dann ist ein kristallisiertes Produkt entstanden, das aus einem Gemisch von 1 Teil Wasser, 5 Teilen Aceton und 50 Teilen Äther umkristallisiert wird.

---

4) Barnes-O'Brien-Reader, Biochemic. J. 26, 2040 (1932).

4a) Kinnersley-Reader-Peters c. s., Biochemic. J. 27, 225 (1933); Nature (Lond.) 1933, 131, 617.

5) Wu, J. of biol. Chem. 43, 189 (1920).

Die Substanz hat die Zusammensetzung $C_4H_4N_4HCl\ 1/2H_2O$. Sie ist löslich in Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol und Aceton. Das Pikrat schmilzt bei 278°. Pauly-, Fehling-, Millon- und Tollenssche Reaktionen sind negativ. Die Substanz verträgt einstündiges Kochen mit 20%iger Salzsäure ohne Verlust der Wirksamkeit. Sie hält sich in einer aceton- oder alkoholhaltigen Lösung unbegrenzt. In wäßriger Lösung tritt selbst bei 0° Verlust der Wirksamkeit auf. Die Substanz ist alkalilabil. Erhitzen der Kristalle mit 10%iger Natronlauge zerstört schon nach 10 Minuten. Die Kohleextrakte enthalten aus 50 kg Hefe etwa 4500—6500 Ratteneinheiten. Nach der Hydrolyse beträgt die Ausbeute durchschnittlich 3000 Ratteneinheiten. Die Wirksamkeit im Eluat der Kohle ist 9—10 mg pro Ratteneinheit. Nach der Merkurisulfatbehandlung sind 4—6 mg pro Einheit erforderlich und nach der Phosphorwolframsäurereinigung nur 0,2—0,5 mg. Die Wirksamkeit der reinen Kristalle beträgt 0,01 mg für eine Ratteneinheit.

Man erhält 20—30 mg Substanz pro Zentner Hefe.

V. Eigenschaften des Vitamins B_4

Das Vitamin B_4 ist thermolabil. Es wird leichter zerstört als das Vitamin B_1. Bei 120° und $p_H = 6$ ist B_1 beständig, B_4 wird zu 50% inaktiviert. Autoklavieren der Hefe zerstört beide. Das Vitamin B_4 ist löslich in Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol oder Aceton.

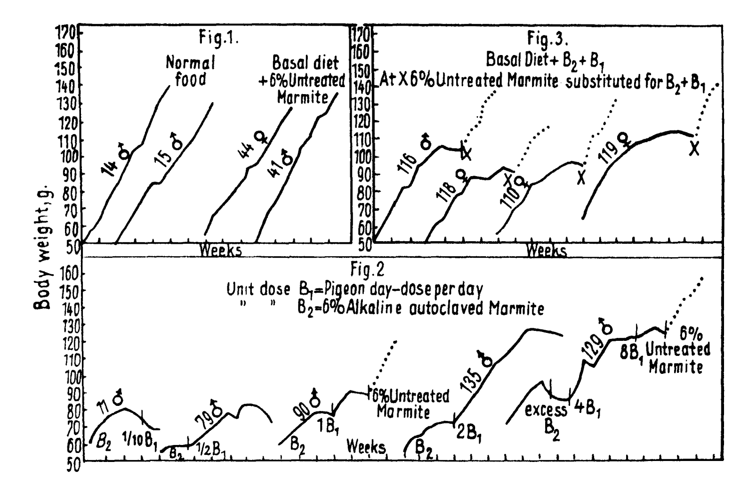


Abb. 86. Zerstörung des Vitamins B_4 durch Autoklavieren.

Es wird durch Merkurisulfat in saurer Lösung, auch durch Phosphorwolframsäure gefällt. Es ist in stark saurer Lösung an Norit adsorbierbar. Die Fällbarkeit mit Merkurisulfat hängt ab vom Reinheitsgrad der Lösung (s. S. 240).

Das Optimum der Fällung mit Phosphorwolframsäure liegt bei $p_H = 2{,}5$ bis 1,0 6).

Das Vitamin ist in Hefeextrakt an Pentose gebunden und muß, bevor es kristallin dargestellt werden kann, durch Hydrolyse getrennt werden.

6) Barnes-O'Brien-Reader, J. of Physiol. 76 (1932).

Moore 7) fand beim Tier eine erhebliche Speicherung des Vitamins B_4, das von der Mutter an die erste Generation und von dieser auch an die zweite in fallender Linie abgegeben wird.

Tschesche 8) konnte nach der beschriebenen Methode kristallisierte Präparate gewinnen, die außer in der B_4-Wirksamkeit in allen ihren Eigenschaften sich wie reines Adeninhydrochlorid verhalten. Heard 9) fand aber reines Adenin vollkommen ohne B_4-Wirkung. Auch Reader ist der Ansicht, daß das Vitamin B_4 am dargestellten Adenin haftet 10).

Das Vitamin B_5 1)

I. Die Erscheinungen der Avitaminose B_5

Das Vitamin B_5 ist ein außerordentlich stabiler Taubenfaktor. Der Gewichtssturz bei Tauben, die nur mit poliertem Reis ernährt werden, kann nicht durch Zugabe von B_1 aufgehalten werden, wohl aber durch Hefeextrakte (Noritadsorbate, die durch 50 %igen sauren Alkohol eluiert wurden).

Füttert man Tauben mit Reis und $B_1 + B_5$, so hört die Gewichtsabnahme auf. Es tritt aber keine Gewichtszunahme ein. Das Vitamin B_5 ist also ein „maintenance"-Faktor, der das Gewicht konstant hält, aber nicht zu Wachstum führt.

Bei Reisernährung bleibt das Gewicht der Taube etwa 30 Tage lang konstant (Versuche können nicht gut über 30 Tage ausgedehnt werden, da dann die Reisernährung auch anderweitig für die Taube nicht genügend ist), aber nur, wenn man 1 g Marmite pro die zugibt.

1 g Marmite enthält etwa 4,3 Taubeneinheiten Vitamin B_1. Legt man diese Menge als B_1-Konzentrat hinzu, tritt trotzdem Gewichtsabnahme ein. Selbst bei Zugabe großer B_1-Dosen kann das Gewicht der Tiere nicht auf derselben Höhe gehalten werden.

Gewichts-maintenance tritt nur dann ein, wenn Zugabe eines Kohleextrakts aus Hefe erfolgt, der den dafür nötigen Faktor enthält. Man stellt sich diesen Extrakt aus dem Kohleadsorbat der Hefe durch Elution mit 50 %igem Alkohol unter Zusatz von Säure her. Ein Kohleeluat mit n/10 Salzsäure, das reichlich Vitamin B_1 enthält, ist wirkungslos.

Das Vitamin B_5, wie der neue Faktor genannt wird, ist verschieden von den bisher bekannten Vitaminen der B-Gruppe. Es ist nicht identisch mit B_3, das zu Gewichtsanstieg führt und außerdem thermolabil und alkalilabil ist. Das Vitamin B_5 ist im Gegenteil stabil gegen Hitze und Alkali und kommt noch dazu im Kinnersley-Extrakt vor, der überhaupt kein Vitamin B_3 enthält. Der neue Faktor kann auch nicht mit Vitamin B_2 identisch sein, da B_2 ebenfalls in dem Kinnersley-Extrakt fehlt. Eine Identität mit B_4 konnte

7) Moore, Amer. J. Physiol. 102, 581 (1932).
8) Tschesche, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 581 (1933).
9) Heard, Nature (Lond.) 1933, 617.
10) Reader, Nature (Lond.) 1933, 131, 617.
1) Carter-Kinnersley-Peters, Biochemic. J. 24, 1832, 1844 (1930).

ausgeschlossen werden, da Zugabe von B_4 selbst in hohen Dosen nicht die maintenance-Wirkung besitzt. Auch die Zufuhr von $B_1 + B_4$ ist nicht imstande, das Gewicht konstant zu halten.

II. Die biologische Auswertung des Vitamins B_5

Als Test auf Vitamin B_5 gilt ein maintenance-Test, wie er bereits unter Vitamin B_1 beschrieben wurde. Man arbeitet mit ausgewachsenen Tauben und ernährt sie 30—35 Tage mit poliertem Reis. Das Vitamin B_1 wird in Form eines Konzentrats verabreicht. Negative Kontrollen nehmen ständig an Gewicht ab. Behandelt man die Tiere mit einer B_5-haltigen Substanz, so bleibt das Gewicht konstant auf derselben Höhe stehen. Während der Versuchsdauer muß Lebertran verabreicht werden. Zulage von Casein zur Reiskost bessert den Zustand der Tiere nicht. Reis allein ist etwa 40 Tage lang für die Taube unter Zusatz aller Vitamine vollwertig.

III. Vorkommen des Vitamins B_5

Das Vitamin B_5 ist reichlich in Hefe und auch in Weizen vertreten.

Eine Tabelle über das Vorkommen der gesamten B-Vitamine sei im folgenden gebracht.

Tabelle 89. 1850. C. W. Carter, H. W. Kinnersley and R. A. Peters

Substance	B_1	B_2*)	B_3	B_4*)	[B_5]
Whole wheat	+	+	+	?	+
Steamed wheat	—	?	+	?	+
Fresh marmite	+	+	Trace	+	+
Alkalised marmite	—	+	—	—	+**)
50% alcohol extracts of norite (Y) . . .	+	—	Trace	+	+
N/10 HCl extracts of norite (X)	+	—	[Trace ?]	—***)	—

IV. Darstellung des Vitamins B_5

Die Darstellung eines Vitamin B_5-Konzentrats kann aus Hefe geschehen. Man stellt zunächst nach den oben gegebenen Vorschriften einen Hefeextrakt her und adsorbiert die Vitamine an Kohle. Durch Elution der Kohle mit 50%igem angesäuertem Alkohol erhält man einen Extrakt, der neben B_4 auch B_5 enthält. Das Vitamin B_5 kann durch Autoklavieren von den labilen Vitaminen der B-Gruppe getrennt werden.

Das Vitamin B_5 zeigt hinsichtlich Löslichkeit und Adsorbierbarkeit dieselben Eigenschaften wie B_1. Es wird nicht gefällt durch Bleiacetat oder Baryt. Es ist an Kohle adsorbierbar. Im Gegensatz zum B_1 wird das Vitamin B_5 nicht durch Salzsäure eluiert, sondern nur durch alkoholische Säure.

Das Vitamin B_5 ist im Gegensatz zu den meisten B-Vitaminen außerordentlich stabil und verträgt Autoklavieren. Erhitzen auf 100° mit n/2 Alkali zerstört das Vitamin nicht. Ebenso ist es gegen Autoklavieren in alkalischer Lösung beständig.

*) Vitamins B_2 and B_4 have not been shown to be needed by the pigeon.

**) A few experiments indicate that vitamin B_5 in YB ist not destroyed by heating for 35 mins. at 100° in presence of N/2 NaOH. Such a treatment we have found previously destroys vitamin B_1.

***) X preparations have been sometimes found to contain vitamin B_4 (Reader).

Das Vitamin F

Sure-Kik-Smith 1) bezeichnen den Wachstumsfaktor des Vitamins B_2, das früher für einheitlich gehalten wurde, mit F. Die Substanz verträgt 6stündiges Autoklavieren bei 125° und $p_H = 9$ unter 9 Atm. Druck. Durch diese Behandlung wird der Pellagraschutzstoff inaktiviert.

Die Substanz F ist demnach mit dem Flavin von Kuhn-György und Wagner-Jauregg identisch. Untersuchungen hierüber liegen jedoch nicht vor.

Der Faktor Y

Chick und Copping 2) machten die Beobachtung, daß junge Ratten, die mit einer vollwertigen Kost ernährt wurden, unter Zugabe der Vitamine A, D, B_1 und B_4, das Vitamin B_2 aber in Form von Hühnereiweiß erhielten, anfangs gut gediehen, aber nach 3—4 Wochen das Wachstum einstellten. Zugabe von autoklavierter Hefe führte zu neuem Wachstum. Hefe enthält also eine Substanz, die im Weißen des Eis fehlt. Sie ist verschieden von den bisher bekannten Vitaminen und wird mit Y bezeichnet.

Füttert man zwei verschiedene Kostformen, die sich nur in der B_2-Zulage unterscheiden, also einmal autoklavierte Hefe und ein andermal Eiereiweiß enthalten, so tritt auf der zweiten Kost sehr bald Wachstumsstillstand auf. Siehe Abb. 87, aus der auch die Wirkung der Hefezugabe ersichtlich ist.

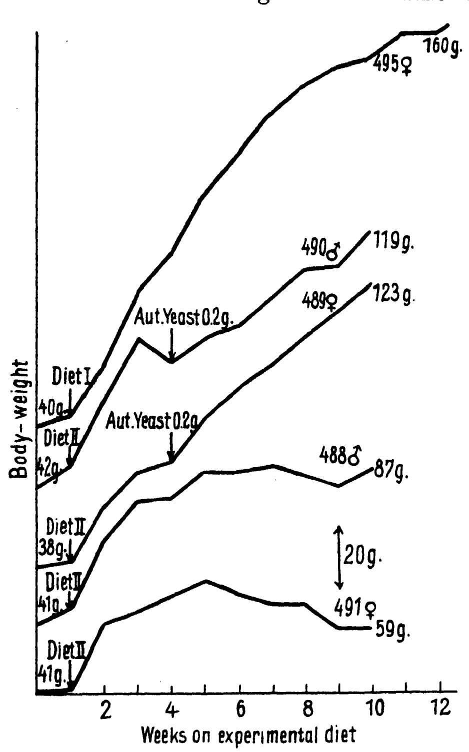


Abb. 87. Gewichtskurven von Ratten auf einer Grundkost mit einer Vitamin B_1-Zulage (Peters Konzentrat) und B_2-Zulage als autoklavierte Hefe (Diet I) oder als Eier-Weiß (Diet II).

Die in der Hefe vorhandene, im Ei fehlende Substanz kommt vor in Leber und grünen Blättern. Sie ist leicht löslich in Wasser und an Kohle adsorbierbar. Der Faktor Y ist im B_1-Extrakt von Kinnersley vorhanden. Er ist gegen Temperatur außerordentlich stabil und verträgt 4stündiges Erhitzen auf 120° bei $p_H = 10$. Über eine evtl. Identität mit B_6 siehe S. 228.

1) Sure-Kik-Smith, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 28, 489 (1931). — Sure-Thatcher-Walker, Arch. of Pathol. 11, 413 (1931). — Sure, J. agricult. Res. 37, 87 (1928).

2) Chick-Copping, Biochemic. J. 24, 1764 (1930).

Der Faktor R

Der Faktor R ist das unlösliche Vitamin. Er ist enthalten in den Heferückständen, die bis zu 14mal oder mehr mit Alkohol steigender Konzentration extrahiert wurden. Alle anderen Vitamine werden dadurch entfernt. Das Fehlen des Faktors R ruft nur eine Abflachung der Gewichtskurve hervor, ohne klinische Symptome. Das Vitamin ist nach bisherigen Angaben nur für Ratten notwendig.

Ratten auf einer vollständigen Kost, die alle Vitamine enthält, wachsen zwar, doch kann das Wachstum bedeutend verbessert werden durch Zugabe der völlig extrahierten Heferückstände. Das Vitamin ist in Wasser, Säuren, Alkohol unlöslich und bleibt selbst bei 14maliger Extraktion mit 0,1 $\%_0$iger Essigsäure im Rückstand. Der Faktor ist thermostabil und gegen Säuren beständig, 5stündiges Erhitzen auf 120^0 bei $p_H = 5$ zerstört nicht. Bei $p_H = 9,4$ wird er schnell vernichtet.

Biologische Auswertung des Faktors R 3), 4), 5)

Zum Nachweis des Faktors R bedient man sich der Gewichtsmethode. Junge Ratten, 4 Wochen alt, werden in Einzelkäfige gesetzt und erhalten ad libitum die Sherman-Spohn-Diät. Das Casein muß gereinigt werden. Man verrührt es zu diesem Zweck mehrere Stunden mit 65 $\%_0$igem Alkohol in der Hitze. Man läßt absitzen und hebert die alkoholische Lösung ab. Dann wiederholt man denselben Vorgang mit Wasser, rührt bei Zimmertemperatur 1 Stunde und läßt über Nacht stehen. Die Wasserextraktion wird im ganzen 4mal wiederholt. Zuletzt verrührt man das Casein mit 80 $\%_0$igem Alkohol und trocknet.

Die Kost muß alle Vitamine der B-Gruppe enthalten. Die Tiere werden in Serien aufgeteilt. Eine bleibt unbehandelt und dient als negative Kontrolle, eine andere erhält eine bestimmte Dosis der völlig extrahierten Hefe und eine dritte erhält die entsprechende Menge der nicht extrahierten Hefe.

Aus der Zuwachswirkung kann man auf den Gehalt an Faktor R einen Schluß ziehen.

Erschöpfende Extraktion der Hefe

Man trägt 2500 g Hefe in 10 Liter kochenden Alkohol ein und läßt 1 Woche lang stehen, indem man mehrmals täglich gut verrührt. Dann wird durch eine Filterpresse abfiltriert. Man wiederholt denselben Vorgang mit 75 $\%_0$igem Alkohol, dann mit 90 $\%_0$igem Alkohol und schließlich mit 95 $\%_0$igem (4 bzw. 2 bzw. 1 Tag extrahieren). Man erhält einen Rückstand, der etwa 1993 g wiegt. Die Extrakte werden auf 2500 ccm eingeengt und mit Wasser auf 5 Liter verdünnt und dann mit je 200 g Fullererde zweimal geschüttelt. (Vorher mit Eisessig p_H auf 3 einstellen.)

Aus der Fullererde bzw. aus der Lösung stellt man sich die Vitamine B_1 und B_2 her. Nach neueren Angaben von Hunt c. s. ist der Faktor R doch teilweise im Hefeextrakt, aber scheinbar in abzentrifugierbarer Form vorhanden. Er kann von Fullererde adsorbiert werden und ist nicht eluierbar.

---

3) Hunt c. s., J. of biol. Chem. 79, 724 (1928); 90, 279 (1931).
4) Lewis-Rymer, J. of biol. Chem. 100 (1933).
5) Williams-Lewis, J. of biol. Chem. 89, 275 (1930).

Das Vitamin H [6], [7]

György fütterte junge Ratten mit einer Diät, die alle bekannten Vitamine in genügenden Mengen enthielt und konnte damit eine generalisierte Hauterkrankung hervorrufen, bei der aber Pellagrasymptome fehlten. Es handelt sich eher um einen Status seborrhoicus mit Übergang in Erythrodermie. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Hautentzündungen an den Achselhöhlen, Leistenbeugen und Urethra. Später tritt Schuppenbildung, Juckreiz, Haarausfall, ausgedehnte Desquamationen, vor allem am Bauch auf, unter Bildung borkiger, panzerartiger Auflagerungen. Gelegentlich sieht man Hauteiterungen und Abszesse. Die Erkrankung ist durch Zufuhr der fehlenden Substanz in wenigen Tagen heilbar.

Bei der Entstehung wirken wahrscheinlich übermäßige Fettzufuhr und Mangel an Vitamin H in gleicher Weise mit. Das Vitamin H ist nicht, wie von Roscoe angenommen wurde, ein Teilfaktor des Vitamins B [8].

Das Vitamin kommt vor in Hefe, Kartoffeln, Leber und Niere. Kuhmilch enthält mehr als Frauenmilch. Das Vitamin ist wasserlöslich, hitzestabil, aber gegen Oxydation empfindlich. Die angewandte Kost war der Goldbergerschen Pellagra erzeugenden ähnlich.

Interessant ist eine Feststellung von Gundel, György und Pagel, die zeigten, daß ein bisher unbekannter, zur Diphtheriegruppe gehörender Krankheitserreger bei H-frei ernährten Ratten pathogen wirkt. Zufuhr von Vitamin H verhütet die Erkrankung.

Das Vitamin C [1], [2], [3]

Der Skorbut, über dessen Entstehung die verschiedensten Ansichten herrschten, wurde 1907—1912 durch die klassischen Untersuchungen von Holst und Fröhlich als Avitaminose erkannt. Das antiskorbutische Vitamin bezeichnen wir heute mit Vitamin C oder Vitamin C_1, zur Unterscheidung vom Eulerschen Vitamin C_2.

I. Die Avitaminose C [3], [4]

1. Der Skorbut

Der klassische Skorbut ist wohl sicher keine reine C-Avitaminose, sondern beruht ebenso auf Mangel an den Faktoren der B-Gruppe. In analoger Weise ist vielleicht die Sprue eine kombinierte Avitaminose, bei deren Entstehung wohl auch der C-Mangel eine Rolle spielt. Die Erscheinungen des Skorbuts sind:

6) Z. ärztl. Forbildg 28, 377 (1931).
7) Vgl. Stepp-Kühnau, Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie 18, 1400 (1932).
8) Roscoe, Biochemic. J. 27, 1533, 1537 (1933).
1) Sherman-Smith, The Vitamins. New York 1931.
2) Browning, The Vitamins. London 1931.
3) Aschoff, Der Skorbut. Jena 1919.
4) Stepp-Voit, Neue dtsch. Klinik 10 (1932).

1. Gingivitis, Schwellung des Gaumens, Lockerung der Zähne.
2. Hämorrhagien und schmerzhafte Schwellungen an den Gelenken, besonders am Kniegelenk.
3. Anämie, die aber nicht sicher auf C-Mangel beruht.
4. Charakteristische Knochen- und Zahnveränderungen.

Für Skorbut besonders charakteristisch sind die Blutungen, die auf der Insuffizienz der Endothelzellen beruhen, intrazellulare Kittsubstanz zu produzieren und zu erhalten, weiter die Zahn- und Knochenveränderungen. Die Zahnveränderungen kommen durch Umwandlung der Odontoblasten in Osteoblasten zustande, die zur Bildung von Knochen an Stelle von Dentin führt. Dabei kommt es zur Verkalkung des Dentins und zur Bildung einer sog. inneren Dentinschicht zwischen Prädentin und Osteoblastenschicht. Die Knochenveränderungen zeigen oft osteoporotische Bilder mit Frakturen. Sie beruhen auf völliger Desorganisation der Knorpelzellen. Typisch sind Ablösungen der Epiphyse, Blutungen im Markraum und an den Frakturstellen. Skorbutischer Knochen zeigt im Röntgenbild typische Veränderungen.

2. Die Erscheinungen des experimentellen Skorbuts beim Meerschweinchen

Die Ernährung eines Meerschweinchens mit einer C-freien Kost führt in etwa 14—20 Tagen zum Symptomenkomplex des Skorbuts. Gelenkschwellungen Hämorrhagien, Zahnveränderungen und Frakturen bilden auch hier die augen-

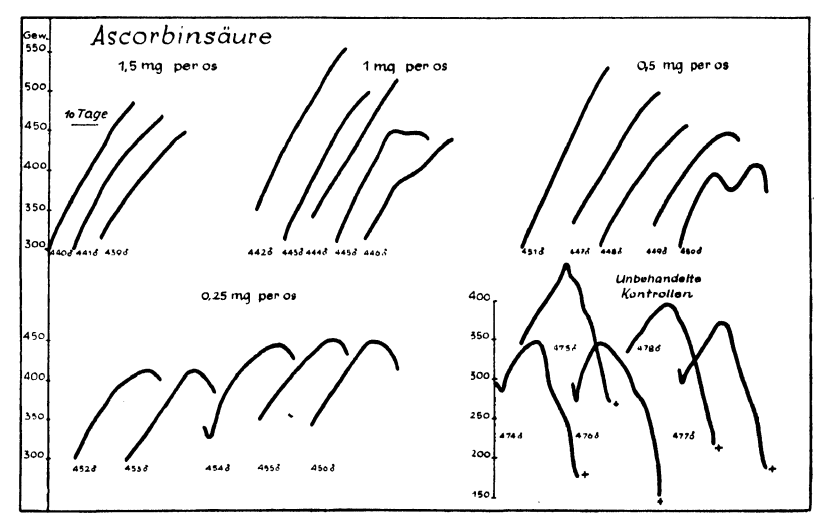


Abb. 88. Gewichtskurven von Meerschweinchen auf skorbutogener Kost mit und ohne Ascorbinsäurezulagen. (Nach Mercks Jahresberichte.)

fälligsten Erscheinungen. Das Gewicht zeigt nach einem durch die Koständerung bedingten vorübergehenden Abfall (3—4 Tage) einen Anstieg bis etwa zum 12.—15. Tag. Dann tritt Gewichtsstillstand ein und schließlich Gewichtssturz um $^1/_3$ oder $^1/_2$ des Anfangsgewichtes. Der Tod erfolgt regelmäßig nach etwa 30 Tagen, spätestens nach 40 Tagen.

Während der zweiten Versuchswoche vermindert sich der Appetit der Tiere und die Munterkeit läßt nach. Die ersten sichtbaren Veränderungen bestehen in einer Auftreibung und Schwellung der Gelenke der hinteren Extremitäten, so daß die Tiere sie schonen und nicht mehr richtig gehen. Sie liegen meist auf der Seite und strecken das schmerzende Glied von sich. Bei Berührung sind Schmerzäußerungen festzustellen. In diesem Stadium hört die Gewichtszunahme auf. Das Fell erscheint unsauber und struppig. Die Tiere sitzen unbeweglich im Käfig. Der Gewichtsverlust tritt ein. Schließlich liegen die Tiere ganz auf der Seite und verweigern die Nahrungsaufnahme. Typisch ist die sog. Skorbutstellung („face ache position"), bei der sie auf der Seite liegen und den Kopf aufstützen. Frakturen sind bei jungen Tieren nicht selten. Ältere entwickeln lediglich eine Steifheit oder Paralyse in den Beinen.

Sektionsbefund

Hämorrhagien: Bei der Sektion findet man stets Blutungen in großer Zahl. Dabei sind gewisse funktionell beanspruchte Stellen bevorzugt. Regelmäßig treten Blutungen auf an den Weichteilen der Kniegelenke, im Unterhautzellgewebe, an der Knochenhaut der Rippen und an der Knorpel-Knochengrenze. Blutungen am Brustbein, Vorderbeinen und Blase sind etwas seltener. Zahnfleischblutungen werden nur bei schwersten Fällen beobachtet.

Zahnveränderungen: Die ersten Erscheinungen des Skorbuts sind schon vor Eintreten der klinischen Symptome an den Zähnen festzustellen. Die Zähne sitzen bei der Sektion gewöhnlich so lose, daß sie ohne weiteres herausziehbar sind. Die Zahnveränderungen treten besonders bei der histologischen Untersuchung zutage. Sie betreffen Dentin-, Prädentin- und Osteoblastenschicht.

Während ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt durch den Schneidezahn das Dentin als breite gleichmäßig gefärbte Schicht zeigt, und das Prädentin eine schmale, weiße, unverkalkte Schicht darstellt, ist beim Skorbut die Dentinschicht schmal und durch Bildung von Knochen sehr ungleichmäßig gefärbt. Das Prädentin ist verkalkt und dunkel.

Während die Odontoblasten normalerweise eine Schicht vollkommen paralleler Zellen bilden, sind sie beim Skorbut unregelmäßig angeordnet und schmäler. Sie sind zu Osteoblasten geworden und bilden Knochen.

Weiter ist eine Erweiterung der Blutgefäße festzustellen, mit Hämorrhagien in die Pulpa, Atrophie und Resorption des Pulpagewebes und der Pulpazellen.

Eine Darstellung der Zahnveränderungen geben Höjer-Westin:

„Die Odontoblasten geraten in Unordnung und verlieren nach und nach ihre Form. Die Ausläuferverbindungen durch das Prädentin mit den Tomesschen Kanälen hören auf und zwischen den Odontoblasten treten rundliche Zellen vom Aussehen der Osteoblasten auf. Gleichzeitig tritt eine amorphe Verkalkung der dentinogenen Zone ein, wodurch diese zu einem für Kernfärbung hyperchromatischen Rande längs am Innenrande des Dentins hervortritt. Später kommt es zu einem vollständigen Verschwinden der Odontoblastenschicht. An der Innenseite des amorph verkalkten Prädentins lagert sich gleichzeitig ein Hartgewebe ab, das anfänglich durch Verkalkung von zusammengebündelten kollagenen Fibrillen zu entstehen scheint, das aber bei fernerem Wachstum zu einem Pulpaknochen vom Typ des geflechtartigen Bindegewebsknochen, aber von spongiöser und poröser Struktur organisiert. Bei der mitigierten Form treten die Gewebszerstörungen in den Hintergrund. Einzelne Odontoblasten oder Gruppen derselben können lange bestehen bleiben. Die Pulpa ändert den Typ von embryonalem Bindegewebe zu

reifem Bindegewebe mit Reichtum an Odontoblasten, die unter sich die Vorstufe des Pulpaknochens, des osteoiden Knochengewebes bilden. Der Pulpaknochen wächst in kräftigen Balken, die sich miteinander gabeln, auf das Pulpazentrum zu. Durch positiv aktive Zellen vom Osteoblastentyp, die dem Pulpagewebe das Aussehen reifen Bindegewebes geben, kommt in der Pulpa eine Neubildung von Hartsubstanz zustande, die den Bau und die Konstruktion des geflechtartigen Knochens annimmt.“

Knochenveränderungen: Die Knochen sind weich und brüchig. Frakturen sind bei jungen Tieren nicht selten. Bei mehr chronischem Verlauf kann typischer Rosenkranz auftreten.

Die skorbutischen Knochenveränderungen wurden besonders von Hojer und Tozer sowie Mouriquand und Brouwer, Hess, McCormik und Findlay untersucht.

Wir finden degenerative Veränderungen der Osteoblasten mit einem Dünnerwerden des Knochens, der aber nicht entkalkt ist.

Die Knorpelknochengrenze der Rippen zeigt zunächst äußerlich Formveränderungen. Histologisch findet man leichte Unordnung der Knorpelzellen und der Trabeculae, dann zunehmende Blutungen im Markraum und schließlich eine Verminderung der Dicke des Knochens, besonders nahe am Knorpel. Später werden die Veränderungen ausgeprägter. Die Knorpelzellen sind verstreut, die Trabeculae verkürzt. Frakturen mit Hämorrhagien treten auf, es bilden sich fibröse Massen im Markraum. Das Knochenmark zeigt viele kleine Hämorrhagien durch gelatinöse und fibröse Degeneration der hämatopoetischen Zellen.

Zwei histologisch verschiedene Formen des experimentellen Skorbuts können erzeugt werden: Eine, die der Definition von Holst und Fröhlich am besten entspricht und bei der abnorme Resorption Hand in Hand geht mit abnormer Neubildung (Auftreibung der Knorpel-Knochengrenze durch Bildung von fehlerhaftem Knorpel, Entstehung des normalerweise nicht vorkommenden fibrösen Marks im Knochen, Resorptionsprozesse, im Trümmerfeld Blutungen) und eine andere, die der Schmorlschen Definition gerecht wird, bei der keinerlei Neubildungen sichtbar werden. (Reine Atrophie, keinerlei Änderungen im Knorpel, keine Neubildung von fibrösem Mark, ausgedehnte Markblutungen, infolge der Resorption verschwinden sämtliche Innenstrukturen des Knochens. Die Wachstumszone wird verkleinert 4a).)

3. Weitere auf C-Mangel beruhende Symptome

Blutveränderungen: Ohata 5) und Mettier 6) und Mitarbeiter berichten neuerdings über hyperchrome Blutbilder mit Retikulozytose, Polychromasie, Anisozytose und Poikilozytose, die durch C-Zufuhr zur Heilung gebracht wurden. Bisher konnten die Veränderungen zwar ab und zu beobachtet werden, sie traten aber nie regelmäßig auf. Die Erythrozytenresistenz scheint dagegen immer erhöht zu sein.

Resistenzverminderung: Die Herabsetzung der Resistenz gegen Infekte und Gifte ist bei experimentellem Skorbut stets vorhanden und führt zum Verlust vieler Versuchstiere an interkurrenten Erkrankungen. Auch die Resistenz gegen einen zweiten C-Mangel ist erniedrigt, indem Tiere, die schon früher an Skorbut erkrankt waren, auf einer skorbutogenen Kost schon sehr bald erneut Skorbut zeigen.

Nervöse Erscheinungen: Nervöse Erscheinungen treten im Verlauf des experimentellen Skorbuts fast immer auf, sind aber bisher selten untersucht.

4a) Kollath, Med. Klin. 1930, 1746.
5) Ohata, Ber. Physiol. 71, 84 (1933).
6) Mettier c. s., J. of exper. Med. 55, 971 (1932).

Temperaturschwankungen: Temperaturschwankungen sind beim Skorbut nicht selten. Über die temperaturregulierende Rolle des Vitamins C sind wir bisher wenig unterrichtet.

Störungen im Pigmenthaushalt: Über Zusammenhänge des Vitamin C-Mangels mit Störungen im Pigmenthaushalt berichtet Morawitz (Pigmentvitamine) 7).

4. Skorbut bei anderen Tieren

Nachdem Kollath festgestellt hatte, daß auch bei der Ratte durch Entzug aller wasserlöslichen Vitamine Skorbut erzeugt werden kann, berichten in neuerer Zeit Holst und Halbrook 8) über Skorbut bei Kücken, die mit Fischmehl, Mais, Hefe, Austernschalen und Lebertran oder Sardinenöl ernährt wurden. Vollkommene Heilung oder Verhütung wurde durch tägliche Zufuhr von 5 g Kohl erreicht.

Die Erscheinungen bestanden in Nervosität, Lähmungen, Steifheit in den Gelenken, Blutungen an den Stoppelfedern (Nacken, Flügel, Beine), Blutungen am Knie und in der Muskulatur (Nacken, Rücken, Brust), Intestinalblutungen und Knochenbrüchigkeit. Außerdem wurde eine Anämie nachgewiesen.

Auch Affen erkranken an typischem Skorbut 9).

II. Methoden zur biologischen Auswertung des Vitamins C

A. Versuchstiere und ihre Haltung

a) Auswahl der Versuchstiere

Die für den Testversuch auf Vitamin C benutzten Meerschweinchen stammen aus eigener Zucht. Bevor sie auf die skorbutogene Kost gesetzt werden, müssen sie sich an die neue Umgebung gewöhnen. Zu diesem Zweck erhalten sie etwa 2—3 Wochen vor Beginn des eigentlichen Versuchs das Grundfutter, unter Zulage einer genügenden Menge C-Vitamin.

Die Tiere werden alle 2—3 Tage gewogen. Nur solche, die ständig zunehmen, kommen nachher in den Versuch, alle anderen, bei denen die Gewichtskurve große Schwankungen zeigt, werden ausgeschaltet.

Während dieser Vorversuchsperiode werden die Tiere angelernt, aus einer Pipette zu trinken, damit sie später während des Versuchs die verabreichte C-haltige Lösung ohne weiteres nehmen.

Bevor sie sich an die neue Umgebung gewöhnen, zeigen sie regelmäßig in den ersten Tagen Gewichtsverlust.

Das Gewicht der von den einzelnen Forschern für den Testversuch benutzten Tiere ist außerordentlich verschieden 9a).

Holst-Fröhlich arbeiteten mit 350 g schweren Tieren, Cohen-Mendel 10) mit solchen, die nur 110—250 g wiegen, Hess und Unger 11) nehmen 200—300 g, Hahn 12) braucht 200 g schwere Tiere. Remy 13) sah gute Ergebnisse mit 290—460 g schweren Meerschweinchen und Saleck 14) braucht entsprechend dem

7) Morawitz, Klin. Wschr. 1934, 324.
8) Holst c. s., Science (N. Y.) 1933, 354.
9) Harden-Zilva, Biochemic. J. 14, 131 (1920).
9a) Cahnmann, Dissert. München 1932.
10) Cohen-Mendel, J. of biol. Chem. 35, 425 (1918).
11) Hess c. s., J. of biol. Chem. 35, 479 (1918); 38, 293 (1919).
12) v. Hahn, Z. Unters. Lebensmitt. 59.
13) Remy, Z. Unters. Lebensmitt. 55, 385 (1928).
14) Saleck, Milchwirtsch. Forschgn 6, 464 (1928).

Vorgehen von Hess-Unger 200—300-g-Tiere. Stiner 15) und Tillmanns 16) und Mitarbeiter brauchen 300—400- oder 200—300-g-Tiere. Im Lister-Institut wird das Gewicht auf etwa 350 g festgelegt. Sherman-La Mer-Campbell 17) brauchen Tiere im Alter von 6—8 Wochen mit einem Gewicht von 300—350 g.

Nach den Erfahrungen von Merck, die wir bestätigen können, sind Meerschweinchen im Alter von 6—8 Wochen mit einem Gewicht von 300—350 g am günstigsten.

b) Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere kann in den oben abgebildeten Käfigen erfolgen. Auch Glashäfen, die eine Bodenfläche von 24 × 29 cm haben und 24 cm hoch sind, haben sich bewährt. Die Käfige müssen als Unterlage eine Schicht Zellstoff erhalten. Sie werden täglich gesäubert und die Unterlage erneuert.

Meerschweinchen gedeihen in Käfigen mit Drahtnetzboden nur schlecht, weil der scharfe Draht den Tieren unangenehm ist. Wir haben deshalb den Boden unserer Käfige mit einem ausgestanzten Aluminiumblech versehen. Auf dieser Unterlage brauchen die Tiere keine Streu.

Die Temperatur des Versuchsraumes soll konstant 18—20^0 betragen.

c) Zahl der Tiere

Von jeder zu untersuchenden Substanz muß man nach der gewöhnlichen prophylaktischen Methode mindestens vier verschiedene Dosen untersuchen. Für jede Dosis genügen 5 Tiere.

Unbedingt nötig sind Kontrolltiere, die einmal unbehandelt gelassen werden, und einmal eine bestimmte Menge eines standardisierten Vitamins C erhalten. Im allgemeinen muß man für 100 Versuchstiere mit 10 positiven und 10 negativen Kontrollen rechnen.

d) Die Form der Fütterung

Die Tiere erhalten eine der beschriebenen skorbutogenen Kostformen und Wasser ad libitum. Vor Beginn des eigentlichen Versuchs werden sie 2 bis 3 Wochen mit einer Zugabe von Vitamin C in Form von Zitronensaft oder aber Gemüse versehen. Die Zulage wird erst bei Beginn des Versuchs abgesetzt.

Die zu prüfende Substanz, die entweder prophylaktisch oder kurativ verabreicht wird, gibt man am besten mit der Pipette. Man kann etwa 5 bis 6 ccm pro dosis 2—3mal am Tag verabreichen. Ist die Substanz nicht flüssig, kann sie mit etwas Milch verabreicht werden. Gemüse kann man höchstens in Mengen von 10—12 g pro Tag geben. Erst wenn diese Menge gefressen ist, erhält das Tier die Grundnahrung. Die zu prüfende Substanz soll nicht, wie vielfach empfohlen wird, zwangsgefüttert werden, das Tier soll sie freiwillig nehmen. Die Zulage von Vitamin C in Form von Zitronensaft während der Vorperiode soll etwa 2 ccm pro Tag betragen.

Bei Hafer-Heufütterung fressen die Tiere pro Tag etwa 15—17 g Hafer und 21—24 g Heu. Der Wasserbedarf beträgt bei 18^0 für ein 250 g schweres Tier mindestens 50—60 ccm pro Tag.

Sehr praktisch ist die Verfütterung einer Kost als Keks. Man knetet die Bestandteile und backt sie in Keksform auf einem mit Olivenöl gefetteten Blech.

---

15) Stiner, Mitt. Lebensmittelunters. 17, 152 (1926); 19, 69 (1928).
16) Tillmans c. s., Z. Unters. Lebensmittel 61 und 63.
17) Sherman c. s., J. amer. chem. Soc. 44, 165 (1922).

Der Vorteil dieser Kost liegt vor allem auch darin, daß man sie direkt ohne Futtergefäße in die Käfige legen kann. Bekanntlich haben Meerschweinchen die Angewohnheit, stets in den Futternäpfen zu hocken und beschmutzen dabei das Futter.

B. Vitamin C-freie Kostformen

Jede C-haltige Kost kann durch genügend langes Autoklavieren C-frei gemacht werden. Bei der Auswahl der Diäten ist aber zu beachten, daß das Meerschweinchen wählerisch ist und auf einer Kost, die ihm nicht zusagt, schlecht gedeiht. Eine Kost aus Hafer und Heu ist auf die Dauer nicht ausreichend. Gewöhnlich gibt man noch Milch dazu, da dann das Allgemeinbefinden der Tiere wesentlich besser ist. Um die Tiere an das Futter zu gewöhnen, wird empfohlen, erst einige Tage lang neben der Kostmischung grünes Gemüse zu verabreichen und die Zulage bei Beginn des eigentlichen Versuchs abzusetzen. Die gebräuchlichsten Kostformen sind folgende:

Nr. 1. Sherman-La Mer-Campbell (l. c. 17).

Haferflocken 39%
Magermilchpulver 30%
Butterfett 10%
Kleie 20%
Kochsalz 1%
Heu und Wasser ad libitum.

Die Mischung aus Kleie und Haferschrot wird mehrere Stunden in flachen Schalen auf 110° erhitzt. Das Butterfett wird bei niederer Temperatur geschmolzen und filtriert. Die Kost muß oft bereitet werden, da sie leicht ranzig wird. Das Heu wird sterilisiert. Das Milchpulver muß in flacher Schicht 2 Stunden auf 100° erhitzt werden. Die Bestandteile werden zu Brei geknetet und gebacken.

Nr. 2. Siehe Scheunert, Tillmanns u. a.

Heu, sterilisiert, ad libitum,
Hafer, sterilisiert, ad libitum,
Milch, autoklaviert, ad libitum
enthaltend Vitamine A und D.

Der Hafer wird auf flachen Schalen im Trockenschrank 24—48 Stunden auf 100° erhitzt. Das Heu wird im Sterilisator behandelt. Die Milch wird im Autoklaven 2 Stunden auf 100° erhitzt.

Nach Tillmanns erhalten die Tiere je nach Größe 30—80 ccm Milch pro die. Das zu untersuchende Präparat wird in der Milch verabreicht. Jedes Tier wird morgens mit 40—50 g Hafer gefüttert. Eine Stunde darauf gibt man 5 ccm Milch mit der zu untersuchenden Substanz. Eine Stunde später folgt die Heugabe (etwa 15—20 g) und gleichzeitig damit oder später die Verabreichung der Hauptmenge Milch. Dieser Teil der Milch enthält die Vitamine A und D (10 g Scotts Emulsion pro Liter). Die Behandlung der Milch ist wichtig. Am besten wird Vollmilchtrockenpulver benutzt. 125 g werden zu 1 Liter Wasser heiß gelöst und der Säuregrad nach Soxleth bestimmt. Dann wird die Lösung mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und durch die noch heiße Lösung 1 Stunde lang ein kräftiger Luftstrom geleitet, wobei die Milch gleichzeitig in fließendem Wasser kühlt. Nach dem Abkühlen wird der alte Säuregrad wiederhergestellt. Da das Vitamin C in alkalischer Lösung gegen Oxydation äußerst empfindlich ist, wird etwa vorhandenes Vitamin zerstört. Serum einer derart behandelten Milch gibt nur eine unerhebliche Reaktion mit dem 2,6 Dichlorphenolindophenolreagens.

Weitere skorbutogene Diäten

Nr.	Autor	Getreide	Heu	Milch	Fett	Salz	Hefe	Sonstiges
3	Holst c. s. 18)	H od. G ad lib.						
4	Hess c. s.	H ad lib.	ad lib.					
5	Chick 19), 19a)	H ad lib. K ad lib.		60 ccm pro die				
6	Sherman	59 % H	—	30 % MP	10 % B	1 % NaCl		
7	Morgan 20)	69 % HF	—	30 % MP	—	1 % NaCl		
8	Eddy c. s. 21)	59 % H+K	—	30 % MP	9 % B	1 % NaCl		
9	Bezssonoff 22)	90 % H 10 % K	—	—	—	—	4 %	Auf 1000 g 75 g Eigelb
10	Randoin 23)				5,5 % B	1,5 % NaCl 5 % Ca-Lakt.	3 %	83 % Bohnenmehl, 2 % Filterpapier
11	Randoin c. s. 24)	64 MS	—		5 % B	1,5 % NaCl 5 % Ca-Laktat, 2 % Osborne-Salz	3 %	17 % Fleischpepton, 2,5 % Filterpapier
12	Hanke c. s. 25)	—	—	—	—	—	—	Okara ad lib.
13	Hanke c. s. 25)	—	—	—	—	1 % NaCl 2 % Ca-Laktat, 1 % Fe-citrat	—	Sojabohnen, autokl., 96 %
14	House c. s. 26)	50 % Wm 50 % Alf. H ad lib.	ad lib.					
15	Pittenger	HF ad lib.	ad lib.	20 ccm pro die				
16	Brouwer 28)	10—15 g H pro die	15 bis 30 g pro die	30 bis 60 ccm pro die				

Zeichenerklärung: H = Hafer, K = Kleie, G = Gerste, HF = Haferflocken, Wm = Weizenmehl, MP = Magermilchpulver, B = Butterfett, VP = Vollmilchtrockenpulver, MS = Maisstärke.

18) Holst c. s., Verh. 6. Nord. Kongr. inn. Med. 1909, 328; J. trop. Med. 23, 461 (1920).

19) Chick c. s., Biochemic. J. 13, 137 (1919); Lancet 2, 785 (1918).

19a) Zilva c. s., Biochemic. J. 15—20 (1921—26); Proc. roy. Soc. Med. 18, 1 (1925).

20) Morgan c. s., J. of biol. Chem. 82, 580 (1929).

21) Eddy c. s., J. Ind. a. Eng. Chem. 16, 52 (1924); 18, 85 (1926); 21, 347 (1929).

22) Bezssonnoff, C. r. Soc. Biol. Paris 183, 921 (1926); Bull. Soc. Chim. biol. Paris 9, 557 (1927).

23) Randoin c. s., Bull. Soc. Chin. biol. Paris 9, 49 (1927).

24) Randoin c. s., C. r. Soc. Biol. Paris 101, 877 (1929).

25) Koessler c. s., J. of biol. Chem. 80, 499 (1928).

26) House-Nelson-Haber, J. of biol. Chem. 81, 495 (1929).

28) Brouwer, Biochem. Z. 187, 183 (1927).

Nr.	Autor	Getreide	Heu	Milch	Fett	Salz	Hefe	Sonstiges
17	Shipp c. s. 29)	325 g K 280 Wm	—	40 ccm pro die	—	—	—	180 g Fischmehl
18	Westin 30)	50 % HF 20 % K	—	15 % MP	5 % B	1 % NaCl 0,5 % Mc. Collum- gemisch	3,5 % Hefe- extr.	
19	Dann	720 g HF 80 g K	—	—	—	84 g Salz- mischung		40 g Eigelb
20	Remy	40 g H 15 g K	—	45 ccm pro die		1 g NaCl		
21	Stiner	Zwieback H ad lib.	ad lib.	ad lib.				Karotten, sterilis.
22	Demole 31)	2 kg HF	—	1 kg VP				6 Eierweiß

Bemerkungen zu vorstehender Tabelle:

Es handelt sich, wenn nicht anders angegeben, stets um autoklavierte oder sterilisierte Bestandteile. Das Getreide wird in flacher Schicht an der Luft erhitzt (48 Stunden auf 100°). Das Heu wird sterilisiert. Die Milch wird als solche autoklaviert, in Pulverform auf flachen Schalen 2 Stunden auf 110° erhitzt.

Zu Nr. 3: Die Tiere erhalten Wasser ad libitum. Zu Nr. 4: Wasser ad libitum. Als Heu Alfalfa. Zu Nr. 5: Die Milch wird 1 Stunde bei 120° autoklaviert. Dieselbe Kost hat Höjer verwandt. Auch Zilva fütterte eine solche Mischung. Vitamin A muß zugegeben werden (etwa 0,1 ccm 3mal wöchentlich an Lebertran). Zu Nr. 6: Magermilchpulver wird wie oben behandelt. Lebertran zufüttern. Zu Nr. 7: Lebertran gesondert verabreichen. Zu Nr. 8: 1 % Lebertran wird der Mischung zugegeben. Wasser ad libitum. Zu Nr. 9: Wasser ad libitum und Vitamin A zulegen. 2 bis 3 ccm Apfelsinensaft pro die schützen auf der Kost ein 400 g schweres Meerschweinchen vollkommen vor Skorbut. Zu Nr. 10: Alle nicht vitaminhaltigen Bestandteile werden autoklaviert. Dazu Wasser ad libitum. Zu Nr. 11: Die Diät wird hergestellt, indem man das Pepton mit der Stärke, den Salzen und dem Filtrierpapier mit Wasser anrührt und 10—15 Minuten kocht. Dann werden Hefe und Butter beigemischt. Ausgewachsene Meerschweinchen zeigen bereits nach 14—16 Tagen die ersten Skorbuterscheinungen. Der Tod erfolgt nach 25—30 Tagen. Heilung bzw. Verhütung des Skorbuts erfolgt durch Verabreichung von 2 ccm Zitronensaft pro die bei 400 g schweren Tieren und durch 3 ccm pro die bei den schwereren. Zu Nr. 12: Die Diät wurde namentlich von Japanern benutzt. Okara ist der Rückstand, der nachbleibt, wenn man fein gemahlenes Sojabohnenmehl mit Wasser extrahiert, wobei Legumin und andere lösliche Proteine entfernt werden. Die Kost erzeugt bei 350—420 g schweren Tieren in 30—35 Tagen Skorbut. Wasser wird ad libitum verabreicht. Zu Nr. 18: Die Butter wird mit 4 % Lebertran versetzt. Wasser ad libitum. Zu Nr. 19: Die Kost wird durch 1 g Lebertran vervollständigt. Wasser ad libitum. Zu Nr. 20: Die Kostmischung wird 1 Stunde auf 100—120° erhitzt. Zu Nr. 22: Die Kost ist unter dem Namen Nr. 111 bekannt. Sie ist sehr zweckmäßig, da sie in Form von Keks verabreicht wird. Das Vollmilchpulver wird in flachen Schalen 2 Stunden auf 120° erhitzt. Es färbt sich gewöhnlich etwas bräunlich. Die Bestandteile werden mit dem nötigen Wasser zu einem festen Teig verrührt, in kleine Kuchen gewalzt und 20—25 Minuten auf einem mit Olivenöl gefetteten Blech gebacken. Die Kuchen sind an der Oberfläche braun (Kruste) und werden von den Tieren gern genommen. Man gibt außerdem Wasser ad libitum und wöchentlich 2 mal pro Tier 0,1—0,2 ccm Lebertran. Gewichtsstillstand tritt gewöhnlich schon nach 10 bis 16 Tagen auf. Unbehandelte Tiere leben 3—4 Wochen. Bei der Herstellung der Kost werden käufliche Haferflocken benutzt. Sie sind C-frei und benötigen keine weitere Vorbehandlung.

29) Shipp-Zilva, Biochemic. J. 22, 1449 (1928).
30) Westin, Z. f. Vitaminforschg 2, 1 (1933).
31) Demole, Z. f. Vitaminforschg 3, 89 (1934).

C. Die Testmethoden für Vitamin C

Das Vitamin C wird entweder im kurativen oder prophylaktischen Versuch ausgewertet. Die prophylaktischen Methoden beruhen einesteils auf Aufsuchen derjenigen Minimaldosis, die bei einem Meerschweinchen unter bestimmten Kautelen die Entstehung des Skorbuts — an Hand eines Sektionsprotokolls — sicher verhütet, oder aber auf der Erscheinung, daß bestimmte Zahnveränderungen bei Zugabe einer genügenden Dosis des Vitamins C ausbleiben.

Die kurative Methode fußt auf der Erscheinung, daß Tiere auf einer sonst vollwertigen, aber C-freien Kost nach einiger Zeit das Wachstum einstellen und an Gewicht abnehmen. Zulage des Vitamin C führt zu neuem Wachstum, entsprechend der zugegebenen Menge.

1. Der prophylaktische Minimaldosistest 32), 33)

Die Methode geht auf Holst und Fröhlich zurück und wurde namentlich von Sherman ausgebaut. Junge Meerschweinchen im Alter von 6—8 Wochen mit einem Gewicht von 300—350 g werden mit einer der angegebenen C-freien Kostmischungen ernährt und erhalten zunächst 3—5 Tage eine Zulage von Grünfutter. Dann wird die Zulage abgesetzt und die Tiere nur mit der Kostmischung ernährt.

Drei Tage nach Beginn dieser Fütterung wird das Gewicht festgestellt und nun fortlaufend 2mal pro Woche registriert.

Man nimmt 5 Serien zu je 4—6 Tieren für jedes auszuwertende Präparat. Die erste Serie erhält eine Zulage von Zitronensaft (etwa 4—5 ccm pro Tier/Tag) und dient als positive Kontrolle. Die zweite Serie bleibt unbehandelt und muß die schwersten Skorbuterscheinungen entwickeln. Die drei anderen Serien erhalten steigende Mengen des auszuwertenden Präparats, etwa 2, 3 und 4 ccm, je nach der vermuteten Wirksamkeit.

Alle Tiere gedeihen zunächst in den ersten 14 Tagen gut. Dann tritt bei den unbehandelten und nicht genügend behandelten Gewichtsverlust ein. Die negativen Kontrollen gehen in 25—30 Tagen zugrunde. Jedes verendete Tier wird genau seziert, die Befunde in eine Tabelle eingetragen. Nach 70 bis 90 Tagen wird der Versuch abgebrochen, alle überlebenden Tiere getötet und seziert. Die Wirksamkeit des verabreichten Präparats ergibt sich aus der Gewichtskurve und aus dem Sektionsbefund.

Bei der Sektion ist namentlich auf den Zustand der Zähne, Knochen, Rippen und besonders auf Hämorrhagien zu achten. Als vollkommen geschützt gilt ein Tier, wenn es von der positiven Kontrolle in keiner Weise zu unterscheiden ist. Diejenige kleinste Menge, die diesen Zustand herbeiführt, ist eine Einheit. Durch Vergleich mit der Wirksamkeit eines Standardpräparats kann man die Wirksamkeit der gegebenen Dosis auf den Standard beziehen.

Der Nachteil der Methode liegt darin, daß es nicht immer gelingt, gleich im ersten Versuch die Minimalschutzdosis festzulegen. Man muß dann noch einen weiteren Versuch ansetzen und die Dosen enger abgrenzen.

In dieser Beziehung ist der Test von Sherman besser.

32) Holst c. s., Z. Hyg. 72, 1 (1912).
33) Delf, Biochemic. J. 12, 416 (1918); 14, 211 (1920).

Man hat neuerdings als eine Einheit diejenige Menge festgelegt, die ein Meerschweinchen 60 Tage lang vor Skorbut vollkommen schützt, wobei man die Einheit auf 200 g Tier bezieht. Eine solche Meerschweincheneinheit ist gleich 10 internationalen Einheiten (s. unten).

Scheunert geht bei der Ausführung des Versuchs anders vor, indem er den Tieren zunächst 4 Wochen lang eine bestimmte Dosis der zu testenden Substanz verabreicht und nun am Gewicht feststellt, ob diese wirksam ist oder nicht. War die Dosis zu klein, so wird sie nach einer bestimmten Zeit erhöht und so fort bis die Dosis gefunden ist, die eben schützt.

Wir halten diese Arbeitsweise mit v. Hahn (l. c. 12) für nicht zulässig, da zu den verschiedenen Zeiten des Versuchs stets verschieden schwer geschädigte Tiere vorliegen. Fand man die Dosis schon beim erstenmal zu klein, so muß sie notgedrungen eine andere sein, als die nach längerem Suchen gefundene.

Weiter ist bei dem Vorgehen von Scheunert der Sektionsbefund illusorisch. Wird bei der zuletzt vorgenommenen Sektion tatsächlich eine Blutung festgestellt, so kann sie aus einem ganz anderen Versuchsabschnitt stammen und nicht nur aus der letzten Versuchsperiode. Dadurch basiert die Methode aber lediglich auf dem Verhalten des Gewichts. Das Gewicht ist aber als Testobjekt allein nicht immer maßgebend (v. Hahn). Nur die Beachtung der Gewichtskurve in Gemeinschaft mit dem Sektionsprotokoll und dem Verhalten des Tieres während des Versuchs macht die Methode zu einer einigermaßen genauen.

Versuchsdauer: Die negativen unbehandelten Kontrollen gehen nach einigen Wochen an schwerem Skorbut ein. Sie nehmen regelmäßig an Gewicht ab. Die Lebensdauer beträgt gewöhnlich 26—34 Tage.

Der Versuch soll mindestens 6 Wochen lang durchgeführt werden. Neuerdings nimmt man 60 Tage. Nach v. Hahn müssen aber wissenschaftliche Versuche mindestens auf 3 Monate ausgedehnt werden.

Bewertung der Gewichtskurve: Interkurrente Erkrankungen, wie Pneumonien, Pseudotuberkulose und parasitäre Erkrankungen (Bandwurmfinnen und Echinokokken in der Leber) können die Gewichtskurve erheblich beeinflussen. Wird das Vorliegen einer solchen bei der Sektion festgestellt, bleibt das Tier bei der Auswertung unberücksichtigt.

Zeigten die Tiere zu Anfang des Versuchs etwa dasselbe Gewicht, z. B. 350 $\pm$ 20—30 g, und wurden sie täglich gewogen nimmt man das Mittel der Gewichte des einen Tages und das der Gewichte des nächsten Tages und errechnet den Unterschied zwischen beiden in Prozenten. Dieser Wachstumsindex wird in ein Koordinatensystem eingetragen, indem als Abszisse die Zeit in Tagen steht.

Weichen die Anfangsgewichte oder die Kurven in ihrem weiteren Verlauf stark voneinander ab, muß von jedem Tier ein Wachstumsindex gebildet werden. Erst aus diesen nimmt man das Mittel.

Die Sektion: Eine Sektion ist in 20—30 Minuten bei einiger Übung durchführbar.

Nach eingehender Inspektion der Organe der Bauch- und Brusthöhle, des Magens und Darms präpariert man mindestens eine hintere Extremität. Man prüft das Verhalten der Knochen, das Aussehen der Rachenhöhle (Zahnfleisch, Zähne, Kieferknochen) und die innersekretorischen Drüsen.

Der Mageninhalt wird auf Blut, Reaktion und evtl. auf Pepsin untersucht. Blutproben werden angestellt mit dem Inhalt von Jejunum, Coecum, Kolon, Gallenblase und Harnblase. Im Harn wird nach Eiweiß gesucht.

Ausdruck der Ergebnisse 34):

Scheunert 35) bezeichnet den Vitamingehalt einer Substanz als sehr gut, wenn pro die 3 g genügen, um ein Meerschweinchen vor Skorbut zu schützen. Die Bezeichnung gut wird gegeben, wenn 4—10 g, und gering, wenn 11—25 g nötig sind.

v. Hahn nennt den Vitamin C-Gehalt außerordentlich hoch, wenn 0,5 g pro die ein Meerschweinchen schützen, sehr gut, wenn 0,6—2 g, gut, wenn 3—6 g, gering, wenn 6—12 g, und praktisch belanglos, wenn über 12 g erforderlich sind.

Der Bedarf des Menschen übersteigt den des Meerschweinchens 50mal. Wenn z. B. für ein Tier 0,5 ccm ausreichend sind, braucht der Mensch 25 ccm.

v. Hahn dividiert 100 durch die gerade schützende Menge und erhält so seine Meerschweincheneinheit (ME.). Wenn z. B. Apfelsinensaft in Dosen von 0,5 g schützt, enthält der Saft 200 ME. Der Mensch braucht pro die 50 ME.

Einen besseren Ausdruck für den Vitamingehalt der Substanz findet v. Hahn bei der Umrechnung auf die Gebrauchsmenge eines Nahrungsmittels. Er bezeichnet den C-Gehalt als extrem hoch, wenn in der Gebrauchsmenge (d. h. in der täglich aufgenommenen Menge) mehr als 120 ME. vorhanden sind. Vitaminreich ist ein Nahrungsmittel, wenn die Gebrauchsmenge 120—50 ME. hat, vitaminhaltig, wenn 50—30 ME. und vitaminarm, wenn 20—12 ME. vorhanden sind. Vitaminfrei sind Nahrungsmittel, die weniger als 12 ME. in der Gebrauchsmenge enthalten.

2. Der prophylaktische Test von Sherman-LaMer-Campbell (l. c. 17)

Meerschweinchen im Gewicht von 300—350 g werden mit der skorbutogenen Diät und Grünfutter ad libitum gefüttert. Dann wird das Grünfutter abgesetzt und die zu prüfende Substanz zugegeben, z. B. 1—1,5—2—3 ccm Tomatensaft. Ein Teil der Tiere bleibt unbehandelt und dient als negative Kontrolle. Sämtliche Tiere werden 3mal wöchentlich gewogen. Bei den unbehandelten Tieren erscheinen die ersten Skorbutsymptome schon nach etwa 12 Tagen. Die Überlebensdauer beträgt 26—34 Tage.

Die Wirksamkeit der prophylaktischen Behandlung ergibt sich aus der Beurteilung des Gewichts und dem Sektionsbefund.

Sämtliche unbehandelten Tiere zeigen in der ersten Zeit eine relativ gute Gewichtszunahme, dann treten plötzlich Gewichtsstürze auf. Die Sektion zeigt schwersten Skorbut, ausgedehnte Hämorrhagien, starke Knochenbrüchigkeit und Veränderungen an den Zähnen, die ohne weiteres herausziehbar sind. Tiere, die 1 ccm Tomatensaft erhalten, leben länger. Sie entwickeln aber ebenfalls Skorbutsymptome, bevor sie eingehen. Die Sektion ergibt etwa dasselbe Bild wie im ersten Falle.

Die tägliche prophylaktische Gabe von 1,5 ccm Tomatensaft hält die Tiere mindestens 70—90 Tage am Leben. Sie zeigen nur mäßigen Gewichtsverlust. Die Verdickungen der Knorpel-Knochengrenze der Rippen, die Hämorrhagien, sind infolge der langen Versuchsdauer weit ausgeprägter als bisher. Die Gelenke sind geschwollen und schmerzhaft. Dagegen sind Zahnveränderungen und die Knochenveränderungen (Brüchigkeit) bei weitem nicht so ausgeprägt.

34) Tillmanns, Z. Unters. Lebensmittel 65, 167 (1933).

35) Scheunert, Der Vitamingehalt der deutschen Nahrungsmittel. Berlin 1930.

Tiere, die täglich 2 ccm Tomatensaft erhalten, sind nach 70—90 Tagen ebenfalls am Leben. Das Gewicht ist schon nach 15 Tagen unternormal. Zähne und Knochen sind vollkommen gesund. Hämorrhagien sind vorhanden, aber nicht sehr ausgeprägt. Die Schmerzhaftigkeit der Gelenke ist in allen Fällen, jedoch ohne Steifigkeit, vorhanden.

Die prophylaktische Gabe von 3 ccm gewährt vollkommenen Skorbutschutz. Das Zeichen (—) bedeutet vollkommenen Schutz. Das Tier ist von einem gesunden nicht zu unterscheiden. Bei (?) ist der Befund zweifelhaft, bei (tr) sind minimale Veränderungen vorhanden. Die Schwere des Skorbuts wird durch die Zeichen +, ++, +++ steigend je nach dem Grad der Veränderungen ausgedrückt. Die bei der Sektion gefundenen Veränderungen werden in nebenstehende Tabelle 90 eingetragen.

Die kleinste Gabe, die vollkommenen Skorbutschutz gewährt, ist eine Einheit. Bei der Beurteilung des Sektionsbildes wird der Sektionsbericht der unbehandelten negativen Kontrollen zugrundegelegt und mit dem jeweiligen Befund verglichen.

Die Methode hat vor dem Aufsuchen der Minimalschutzdosis den Vorteil, daß sämtliche Versuche verwertet werden können und nicht nur der eine mit der Minimalschutzdosis.

Bei einem Vergleich geht man zweckmäßig immer von der pro 300 g Gewicht des Tieres verabreichten Menge aus und setzt diese als eine Einheit fest. Kenny bringt eine Tabelle der Veränderungen (90) und wertet diese nach der Anzahl der +- und —-Zeichen aus.

Meist genügt eine Versuchsdauer von 60 Tagen. Diejenige Menge an Vitamin C, die pro Tag verabreicht, während dieser Zeit bei 200 g schweren Tieren die Entstehung des Skorbuts verhütet (minimale protektive Dosis), ist eine Einheit. Bei Zitronensaft ist sie im allgemeinen in 1,5 ccm enthalten. Kristallisiertes Vitamin C genügt den Anforderungen in täglichen Mengen von 0,9 mg 36), 37), 38).

3. Der Schneidezahnwurzeltest 39)

Schon lange vor Eintreten manifester Skorbutsymptome sind Veränderungen an den Wurzeln der Schneidezähne festzustellen. Durch Zugabe von Vitamin C können diese mikroskopischen Veränderungen verhütet oder geheilt werden, eine Reaktion, die zum Nachweis des Vitamin C ausgearbeitet wurde.

Junge Meerschweinchen im Alter von 6 Wochen mit einem Gewicht von 250—300 g aus eigener Zucht (genügend grünes Gemüse und Apfelsinensaft!) erhalten eine skorbutogene Diät und Wasser ad libitum. Man benutzt am besten die Diät von Sherman-Göthlin. Die Tiere werden aufgeteilt. Man gibt verschiedene Dosen der Substanz, die auszuwerten ist und hält außerdem 2 Tiere als positive und 2 als negative Kontrollen. Nach 14 Tagen werden alle Tiere getötet und die Schneidezähne untersucht.

36) Waugh-King, J. of biol. Chem. 97, 325 (1932).
37) Fellers-Isham, J. agricult. Res. 47, 163 (1933).
38) Harris-Ray, Biochemic. J. 27, 580 (1933).
39) Höjer c. s., Vjschr. Zahnheilk. 40, 247 (1924); Dent. Cosmos 67, 1 (1925); Brit. J. exper. Path. 7, 356 (1926); Studies in Scurvy Upsala 1924; Acta Pediatr. 3, 34 (1924).

Tabelle 90. Protocols of Experimental Animals on Basal Diet Alone or with Antiscorbutic

Animal No.	Tomato juice cc.	Body Weight			Duration of Experiment	Symptoms	Autopsy Findings							
							Bony System					Hemorrhages		
		Initial grams	Maximum grams	Final grams			Jaw	Teeth	Ribs	Joints	Ribs	Intestines	Joints	Muscles
143 ♂	0,0	361	439	219	28 days	Very severe	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
193 ♀	0,0	329	351	182	34 ,,	Very severe	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
207 ♂	0,0	321	350	192	28 ,,	Very severe	+ + +	+ + +	+ + +	+	+ + +	+ +	+ +	+ +
173 ♀	1,0	312	405	269	90*) ,,	Very severe	+	—	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	+
184 ♂	1,0	321	384	255	53 ,,	Very severe	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+	—	+ +
90 ♀	1,4	332	394	201	41 ,,	Severe	+	+	tr	tr	+	+ + +	—	tr
93 ♂	1,4	321	468	285	63 ,,	Severe	+	+	+ + +	+ + +	+ + +	+	+ + +	
92 ♂	1,5	332	368	285	91*) ,,	Severe	tr	tr	+ +	+		+		tr
94 ♀	2,0	309	340	311	87*) ,,	Moderate	—	—	+	+ +	—	+	+ +	tr
95 ♂	2,1	282	388	345	91*) ,,	Moderate	—	—	?	+	—	—	+	—
155 ♂	(a)	320	402	383	73*) ,,	Mild	—	—	+	+		tr	—	—
181 ♀	(b)	323	503	475	85*) ,,	Mild	—	—	? tr	—	—	tr	—	—
199 ♀	(c)	337	505	492	85*) ,,	Very mild	—	—	? +	—	—	+	—	—
130 ♂	(d)	337	415	390	73*) ,,	Moderate	—	—	+ +	—	—	+	+	+

(a) Received 3,9 cc. tomato juice which had been heated one hour at 100° C. judged equal to 2,0 cc. of raw juice.
(b) Received 7,0 cc. tomato juice which had been heated four hours at 100° C. judged equal to 2,5 cc. of raw juice.
(c) Received 4,0 cc. tomato juice which had been heated four hours at 60° C. judged equal to 2,5 cc. of raw juice.
(d) Received 2,3 cc. tomato juice which had been heated one hour at 60° C. judged equal to 1,75 cc. of raw juice.

*) These animals were killed for autopsy; the others died of scurvy.

Die Kiefer werden schnell herausgenommen und in 5%iger Trichloressigsäure entkalkt. Nach 1 Woche werden sie in Paraffin eingebettet und geschnitten. Man legt den Schnitt durch den vorderen Molaren rechtwinklig zur Kieferlängsachse. Den einen Teil der Schnitte färbt man mit Hämatoxylin-Eosin, den Rest mit Trioxyhämatin.

Besondere Beachtung finden bei der Prüfung unter dem Mikroskop die Schnitte durch die Schneidezahnwurzel.

Bei ausreichendem Skorbutschutz sieht man im Schnitt eine breite, ganz gleichförmig gefärbte Schicht von Dentin. Das Prädentin bildet eine weiße ungefärbte Schicht und die Odontoblasten sind in vollkommen parallelen, langen Reihen angeordnet. Das Pulpagewebe zeigt gleichmäßig angeordnete Zellen.

Bei ungenügender Dosis ist die Odontoblastenschicht schmäler. Bei noch kleineren Dosen ist die gleichmäßige Färbung der Dentinschicht verschwunden.

Bei negativen Kontrollen ist die Dentinschicht sehr dünn, das Prädentin ganz dunkel gefärbt, da es verkalkt ist. Die Odontoblasten sind nicht mehr in einer kontinuierlichen Linie angeordnet.

Ein Auswertungsbeispiel ist in nebenstehender Tabelle angegeben.

Die Fehlergrenze der Methodik soll nicht mehr als etwa 10% betragen. Goettsch 40) und Key sowie Eddy 41), die die Methode mit der ersten verglichen, kommen zu dem Schluß, daß sie besser und empfindlicher ist als die gewöhnliche prophylaktische. Die Einheit ist nach der vorliegenden Methode doppelt so groß als die Sherman-Einheit. Man gebraucht hier 2 ccm, während man dieselbe Wirkung im Shermantest schon mit 1 ccm erzielt.

Ein weiterer Vorteil ist natürlich die Zeitersparnis, die ganz erheblich ist.

Namentlich Goettsch hat eine eingehende Schilderung der Methodik gegeben (s. Tabelle 91).

Die individuellen Schwankungen der Methode sind recht erheblich. Eine genaue Auswertung wird nur dann möglich, wenn die Dosis bestimmt wird, die sämtliche damit behandelten Tiere vor Skorbut schützt. Diese Einheit ist, wie erwähnt, doppelt so groß wie die Shermansche 41a).

Histologische Verarbeitung des Zahnmaterials von Meerschweinchen

Entnahme des Materials aus der frischen Leiche. Auslösen der beiden syndesmotisch verbundenen Unterkieferhälften aus dem Ganzen der Kiefergelenke. Der Oberkiefer muß im ganzen mit Teilen der Schädelbasis vom Schädel getrennt werden. Aufbewahrung des Materials in 10%igem Formalin.

Entkalkungstechnik. Beschleunigte Härtung in 10%igem Formalin durch 8—10 Stunden im Brutschrank bei 37°. Über Nacht Wässern im laufenden Wasser. Hierauf Einlegen in 5%ige Salpetersäure solange, bis die Konsistenz der Zähne knorpelweich ist (durchschnittlich 5 Tage), täglich wechseln.

Neutralisation in 5%igem Natriumsulfat ebensolange wie die Entkalkung mit Salpetersäure dauert, bei häufigen Wechsel 2 Tage. Hierauf 24 Stunden Wässern im laufenden Wasser.

Einbettung in Zelloidin. Entwässern durch Führen durch die Alkoholreihe, 70%iger Alkohol 2 Tage, 2mal wechseln.

95%iger Alkohol, ebenfalls 2 Tage, 2mal wechseln.

Absoluter Alkohol, 3 Tage.

---

40) Goettsch, Proc. Soc. exper. Biol. a Med. 27, 71 (1929); Quart. J. Pharm. 1, 168 (1928).

41) Eddy, Amer. J. publ. Health 19, 1309 (1929).

41a) Vgl. Harris-Mills-Innes, Lancet 1932, 235.

Tabelle 91. **Determination of the Antiscorbutic Value of Food by Höjer's Method**

	Part of Protective Dose
1. Dentine of normal size; its inner and outer layer uniformly coloured; predentine regular, uncalcified; dentine and predentine holding collagen:	
(a) Odontoblasts long, slender, parallel, of equal height	1,0
(b) Odontoblasts partly shorter	0,9
2. Dentine very thin, uniformly coloured; odontoblasts parallel, short	0,8—0,3
(The degree of osteoporosis, hyperaemia, and collagen permits the distinguishing of different stages, but not very sharply. Those animals whose dentine formation seems to have been arrested are therefore excluded)	
3. Dentine in inner and outer layer differently coloured:	
(a) Odontoblasts on the larger pole of the incisor cross-section short and parallel	0,8—0,3
(1) The Tomes' canals going parallel through a normal predentine	0,8
(2) The uncalcified predentine defective formation of network bone beginning	0,7
(3) Uncalcified predentine lacking	0,7—0,5
(4) Network bone formation greater	0,4
(5) Tomes' canals in the old dentine widened .	0,3
(b) Odontoblasts on the larger pole of the incisor cross-section no longer in continuous layer . . .	(0,3—) 0,2—0,0
(1) Tomes' canals in the outer layer of new bone	0,2
(2) No Tomes' canals in the new bone, osteoporosis and hyperaemia well developed	0,1
(3) The old odontoblasts in greatest disorder, osteoporosis, and hyperaemia very evident . .	0,0

A tooth section showing the picture 3 (a) (1), with 0,5 gram of antiscorbutic daily would permit prediction that the fully protective dose of that antiscorbutic would be 0,622 gram (0,5 gram = 0,8 x).

Ätheralkohol ana 2 Tage, täglich wechseln.

Einlegen des Präparats in dünnes Zelloidin für mindestens 12 Tage. Dasselbe in dickem Zelloidin ebensolange.

Herstellung des dünnen Zelloidins. Färbung der Zelloidinschnitte mit Hämalauneosin. ½ Tafel Zelloidin = 20 g wird in 200 ccm Alkohol aufgequellt. Die gequollenen Würfel werden dann in 250 ccm Äther aufgelöst. Dickes Zelloidin: Dasselbe mit einer ganzen Tafel = 40 g.

Die in 70%igem Alkohol aufbewahrten Schnitte kommen für 1 Minute in Leitungswasser, hierauf in Hämalaun nach Mayer (Leitz, Berlin) für 10—15 Minuten. Hierauf Einbringen in Leitungswasser für 10—15 Minuten. Wechseln des Leitungswassers. Bläuen oder Ausdifferenzieren im Wasser, bis die Kerne allein blau erscheinen. Die Schnitte werden vom Wasser in verdünnte Eosinlösung für 2—3 Minuten gebracht.

4. Modifikation der Zahntestmethode nach Key-Elphick 42)

Key und Elphick 42) modifizierten die Methode von Höjer, indem sie die Veränderungen der Zähne in eine Skala bringen, die eine bessere Auswertung der Ergebnisse gestattet.

42) Key-Elphick, Biochemic. J. 25, 888 (1931).

Junge Meerschweinchen werden 14 Tage lang auf eine der angegebenen skorbutogenen Kostformen gesetzt. Eine Gruppe erhält täglich eine bestimmte Dosis der zu prüfenden Substanz, eine andere ein Standardpräparat, eine dritte bleibt unbehandelt und dient als negative Kontrolle. Nach 14 Tagen werden die Tiere getötet und die Veränderungen der Zähne untersucht. Der Versuch wird je nach dem Grad der Veränderungen mit steigenden Zahlen 0—4 versehen.

Dabei bedeutet 0 = vollkommener Skorbut. Desorganisation der Odontoblasten, breites inneres Dentin, verkalktes Prädentin.

1 = Herdweise Desorganisation der Odontoblasten oder schmales inneres Dentin, sonst wie 0.

2 = Odontoblasten nur an der Pulpa desorganisiert, Prädentin teilweise verkalkt, feiner Saum von innerem Dentin.

3 = Beginnende Desorganisation der Odontoblasten an der Pulpa sonst normal.

4 = Normal.

Tabelle 92

Odontoblasten	Inneres Dentin	Prädentin	Tomes's Kanäle	Grad des Skorbutschutzes
Desorganisiert	Weit in die Pulpa eindringend	Verkalkt	Nur im äußeren Dentin	0
Stellenweise vollständig desorganisiert, mitunter auch parallel gelagert	Eng und unregelmäßig	Verkalkt	Nur oder meistens im äußeren Dentin	1
Alle parallel, mit beginnender Desorganisation in der Nähe der Pulpa	Eng	Verkalkt oder teilweise verkalkt	Meistens im äußeren Dentin, oder innerem und äußerem Dentin von den Odontoblasten aus durchquert	2
Lang und parallel, mit beginnender Desorganisation in der Nähe der Pulpa	Fehlt oder schmaler Rand	Unverkalkt	Dentin von Odontoblasten aus durchquert	3
Lang und parallel	Abwesend	Unverkalkt	Dentin von Odontoblasten aus durchquert	4

Tabelle 93

Tägliche Dosis Ascorbinsäure	Zahl der Tiere	Klinischer Befund	Makroskopischer Skorbutbefund bei der Zerlegung	Grad der Zahnveränderung nach der Einteilung von Key und Elphick
Unbehandelt	5	Vom 20. Tag an Schmerzhaftigkeit der Gelenke, Skorbutstellung und Tod am 31. bis 33. Tag	Schwer	**0** (Tafel 89, Bild 1)
0,25 mg	5	Ohne Befund	Mittelgradig	**1** (Tafel 89, Bild 2)
0,5 mg	5	Ohne Befund	Fehlt	**2** (Tafel 89, Bild 3)
1,0 mg	5	Ohne Befund	Fehlt	**3** (Tafel 89, Bild 4)
1,5 mg	3	Ohne Befund	Fehlt	**4** (Tafel 89, Bild 5)

Die Autoren haben bei einem großen Tiermaterial verschiedene Dosen Orangensaft ausgewertet und daraus Durchschnittswerte berechnet. Es entspricht einer Dosis von 0,75 ccm einem Skalenwert von 1,4, eine Dosis von 1,5 ccm einem solchen von 2,4 und eine 3-ccm-Dosis einem Wert von 3,9.

Ein Beispiel aus Mercks Jahresberichten 1933 bei Auswertung der Ascorbinsäure sei angeführt (Tabelle 92 und 93; Abb. 89). Kost Sherman-La Mer-Campbell. Am 33. Versuchstage wurden alle Tiere getötet (Tabelle 93).

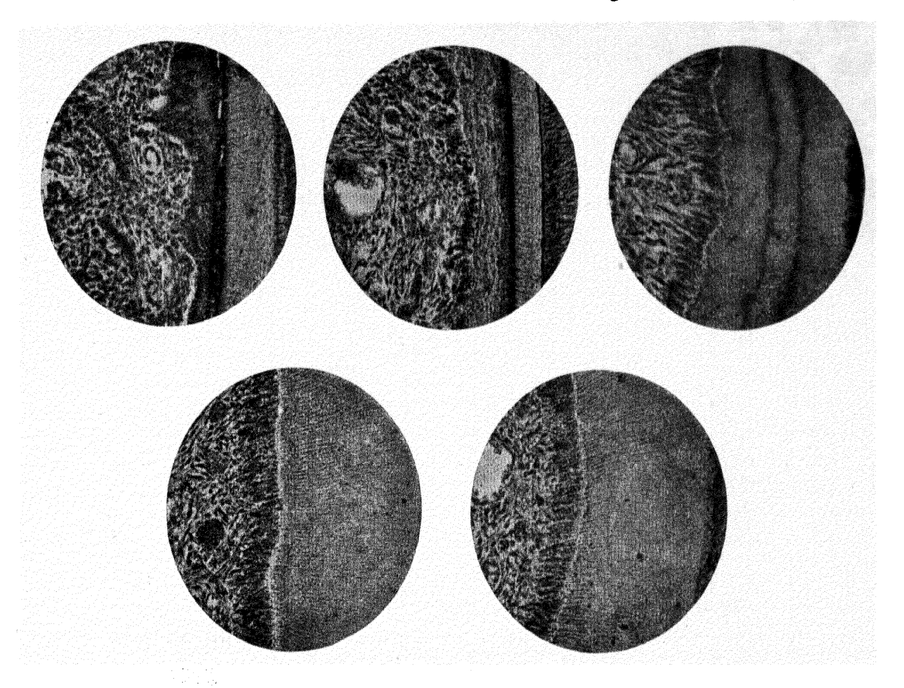


Abb. 89. Die Skorbutgrade nach Key-Elphick.
Obere Reihe von links nach rechts Stadien 0, 1, 2.
Untere Reihe von links nach rechts Stadien 3 und 4.

Harris und Rey (l. c. 38), die den kurativen Wachstumstest mit der Zahnmethode vergleichen, fanden nach der Methode von Key folgende Werte (vgl. Abb. 90):

Tabelle 94

Material	Dosis pro die	Skalawerte
Nebennierenrinde . . .	0,5 g	2, 2, 1 i. D. = 2
,,	1 g	4, 4, 4 ,, = 4
,,	2 g	4, 4, 4 ,, = 4
Apfelsinensaft	1,5 ccm	3, 2 ,, = 2—3
,,	3 ccm	4, 4 ,, = 4
,,	5 ccm	4, 4 ,, = 4
Unbehandelt	—	0, 0, 0 ,, = 0

Tabelle 95. Comparison of antiscorbutic activities of hexuronic acid (from paprika) and orange juice by the tooth-structure method

Amount of material fed per day	Degree of protection
Hexuronic acid, 2 mg.	4, 3, 4 (av. 3,7)
,, 1,75 mg.	2–3, 3, 4 (av. 3,2)
,, 1,5 mg.	2, 2–3 (av. 2,2)
,, 1,25 mg	1, 2, 1 (av. 1,3)
Orange juice, 3,0 cc.	4, 3, 4 (av. 3,7)
,, 2,5 cc.	2–3, 2–3, 2–3 (av. 2,5)
,, 2,0 cc.	1–2, 1, 2 (av. 1,5)
,, 0 cc.	0, 0 (av. 0)

Auch Dann 43) fand gute Übereinstimmung:

Tabelle 96. Examination of the experimental animals for signs scurvy

Guinea pig	Daily addition to basal diet	State of growth after 16 days	Haemorrhage of knee joints	Beading of ribs	Degree of protection from scurvy shown by the teeth
1	None	Losing weight rapidly	+ +	+ +	1
2	,,	,,	+	+	0
3	,,	,,	+ +	+	0
4	0,5 mg. glycuronolactone	,,	+ +	+ +	1
5	,,	,,	+	+	0
6	,,	,,	+ +	+ +	0—1
7	0,5 mg. glycuronolactone + 10 γ "30% methyl-nornarcotine"	,,	+	+	1
8	,,	,,	+ +	+ +	0
9	,,	,,	+	+ +	0
10	10 γ "30% methylnornarcotine"	,,	+	+	0
11*)	,,	—	—	—	1
12	,,	Losing weight rapidly	+ +	+	0
13	10 g. cabbage	Growing well	0	0	4
14	,,	,,	0	0	4
15	,,	,,	0	0	4

Explanation of symbols

Column 4. 0 signifies no haemorrhage.
+ signifies slight haemorrhage.
+ + signifies severe haemorrhage.

Column 5. 0 signifies no rib-beading.
+ signifies slight rib-beading.
+ + signifies very marked rib-beading.

Column 6. The figures correspond to the scale drawn up by Key and Elphick, 0 indicating no protection, and 4 indicating complete protection from scurvy.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß Methylnarkotin unwirksam ist.

*) Guinea-pig No. 11 died on the tenth day of the experiment, and no examination of the joints or ribs took place.

43) Dann, Biochemic. J. 27, 220 (1933).

Die Methode liefert nur bei Anwendung eines genügend großen Tiermaterials brauchbare Werte. Von 20 negativen Kontrolltieren zeigen etwa nur 60% das Stadium 0. Die anderen verteilen sich auf die Stadien 1—4 (!). Die Methode liefert die besten Werte, wenn etwa 300—350 g schwere Tiere in den Versuch kommen.

5. Der Schneidezahntest von Westin 44)

Westin erhebt gegen die bisherigen Methoden neuerdings Einspruch. Höjer und Westin hatten Querschnitte des Vorderzahns gemacht und den Schnitt durch den ersten Molaren gelegt, also im apikalen Drittel des Nagezahns. Gleichzeitig wurden Längsschnitte des ersten Molaren bukkal-lingual geschnitten. Höjer begnügt sich mit Querschnitten durch den Unterkieferinzisiven. Wilton untersucht nur die Zahnkrone. Die primären Zahnveränderungen treten in der Inzisivspitze auf, und zwar in dem in der freiliegenden Krone befindlichen Pulpateil.

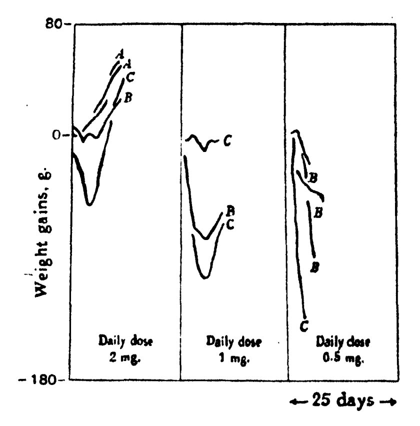


Abb. 90. Kurativer Gewichtstest auf Vitamin C mit Ascorbinsäure aus Nebenniere (A), aus Paprika (B) und mit gereinigter Ascorbinsäure (C).

Nun sind aber nach Westin die Veränderungen von Fall zu Fall so ungleichmäßig, je nach dem Grad des Vitaminmangels und je nach der Geschwindigkeit des Heilungsprozesses, daß eigentlich keine der angegebenen Methoden die Veränderungen erfaßt. Bei nur schwachem Vitaminmangel entwickelt sich ein latenter Skorbut, dessen Zahnveränderungen das apikale Drittel des Zahns nicht erreichen, sondern sich im koronalen Drittel abspielen, mit primären Veränderungen gegen die Mitte des Zahns zu. Wenn also der C-Mangel nur wenige Tage bestand, haben die Veränderungen das apikale Drittel gar nicht erreicht. Umgekehrt wächst das Heilungsblastem (z. B. im kurativen Zahntest) vom Apex gegen die Kronenspitze zu, und zwar je nach der Dosis schneller, so daß die Heilung nicht sofort das koronale Drittel erreicht. Wenn daher die Untersuchungen auf das apikale oder koronale Drittel beschränkt bleiben, erhält man unrichtige Ergebnisse.

Die Diagnose nach der Höjerschen Methode ist nur sicher, wenn der Querschnitt Skorbut zeigt. Wenn das apikale Ende aber normale Bilder aufweist, ist es kein sicherer Beweis dafür, daß die C-Zufuhr wirklich ausreichend war. Es können trotz schöner Bilder im apikalen Drittel latente skorbutische Veränderungen mit irregulärer Dentinbildung, Odontoblastenzerstörung, Pulpavaskularisation und sogar Blutungen im koronalen Drittel und selbst gegen die Mitte vorkommen. Die Heilung kann im apikalen Drittel abgelesen werden. Ist sie aber schon eine gewisse Zeit in Gang oder sind von vornherein große Dosen des Vitamins gegeben, so kann das Heilungsstadium das apikale Ende schon passiert haben. Wilton kann zwar das Normalstadium und das latente skorbutische Stadium ablesen, aber die Heilung gibt Bilder, die einem älteren Stadium entstammen, als dem wirklich vorliegenden.

Daher ist es nötig, sowohl Querschnitte als auch Längsschnitte des Zahns zu studieren. Die Längsschnitte dienen zur Kontrolle und Übersicht, die Querschnitte zur Beurteilung des Skorbuttyps und zu Detailstudien der Odontoblasten.

Da der Zahn lateral nach der Seite abbiegt, kann man keinen Längsschnitt des ganzen Zahns bekommen. Man nimmt daher Längsschnittserien des koronalen

44) Westin, Z. f. Vitaminforschg 2, 1 (1933).

Drittels, das übrige des Vorderzahns wird quergeschnitten. Man legt ferner einen Längsschnitt durch die apikale Hälfte des Zahns von der Molargegend, wo der Schnitt nach der Längsachse placiert wird, mit Schnittrichtung medial-distal und die Serie lingual-bukkal verlaufend. Man erhält so von jedem Tier Längsschnitte durch den ganzen Zahn, wodurch der Inzisivzahn das Bild der koronalen und die Molarpartie das der apikalen Hälfte liefert, während gleichzeitig die verschiedenen Gruppen Querschnitte von der Mittelpartie und dem apikalen Ende des Inzisiven geben.

Der Test wird mit 250—300 g schweren Tieren ausgeführt, die vor dem Versuch, grünes Gemüse und Apfelsinensaft als Zusatz zur Zuchtdiät erhalten. Benutzt wird die Sherman-Göthlin-Kost. Der Test kann prophylaktisch oder kurativ gehandhabt werden. Die Kiefer werden so schnell als möglich herauspräpariert, die eine Hälfte in Formalin, die andere in 25 %igem Formalin (mit Sublimat gesättigt) gelegt und mit 5 %iger Trichloressigsäure entkalkt.

Im prophylaktischen Test mit der Zugabe von 7 ccm Apfelsinensaft pro die zeigt der Querschnitt einen vollkommenen Normalzustand mit normalem Odontoblastem, Pulpagewebe, einer dünnen gleichmäßigen Prädentinzone und einer normalen Dentinverkalkung. Bei Zugabe von nur 5 ccm pro die ist kein vollkommener Schutz zu erreichen. Die koronale Spitze des Inzisiven zeigt deutliche Vaskularisation und Blastemzerstörung, aber keine Verzackung und keine Pulpaknochenbildung. Der Querschnitt vom Anfang des koronalen Drittels zeigt normales Dentin, eine dünne Prädentinlinie und normale Odontoblasten. Das Pulpagewebe ist normal. Die prophylaktische Dosis von 3—5 ccm pro die erzeugt latente Zahnzerstörungen gegen das apikale Drittel. Bei Zugabe von nur 2 ccm ist nach 14 Tagen beginnender Skorbut im koronalen $^2/_3$ festzustellen. Nach 27 Tagen ist eine mitigierte Skorbutform mit Pulpaknochenbildung voll entwickelt. Die negativen Kontrollen zeigen schweren Skorbut, starke Pulpaatrophie und hydrophische Degeneration, Odontoblastemzerstörung bis Odontoblastemverlust, schwere degenerative Wandverkalkung. Beim schwersten Stadium sind die Veränderungen bis tief in das apikale Drittel gedrungen, das Odontoblastem ist völlig verschwunden. Es finden nur amorphe Verkalkungen statt.

Bei der Heilung des Skorbuts im kurativen Test findet man bei der fast völligen Wiederherstellung des normalen Bildes noch eine amorphe Verkalkungslinie des 10tägigen Skorbuts in der äußeren Zone des Dentins. Bei Verabreichung von täglich 5 ccm Apfelsinensaft zeigen sich nach 10 Tagen große Odontoblasten, die Dentin aufbauen. Dieses Normaldentin schließt aber während der raschen Reparation Pulpagewebespartien und Gefäßpartien mit ein. Die amorphe verkalkte Wandlinie des 10tägigen Skorbuts ist meist noch zu sehen. Die Dentinproduktion hat nicht unmittelbar hinter der Verkalkungslinie angefangen, sondern weiter gegen die Pulpa zu, geschieden von der normalen Verkalkungslinie durch eine zeitiger aufgebaute, dentinartige, fast kanalfreie Übergangszone. Das erste Zeichen der Heilung ist eine ungleichmäßig geformte Schicht zwischen den neugebildeten Zellen und der skorbutisch veränderten Dentinwand, die einen Ansatz zu einer Osteoid-Prädentinzone darstellt.

6. Der kurative Wachstumstest 45)

Junge Meerschweinchen im Gewicht von 250 g werden auf eine C-freie Kost gesetzt, die aus 720 g Hafer, 18 g Kleie, 40 g Eigelb, 8,4 g Salzgemisch und 1 % Lebertran besteht. Sie erhalten zunächst dazu 10 Tage lang 15 g Gemüse pro Tag. Nach dieser Vorperiode wird die Zulage abgesetzt und das Gewicht der Tiere registriert.

Nach etwa 2—3 Wochen erscheinen die ersten Zeichen des Skorbuts. Man wählt für den Test nur diejenigen Tiere aus, die Skorbutsymptome zeigen und etwa 10 g ihres Gewichts, vom erreichten Höchstgewicht gerechnet, verloren haben (10—20 g zulässig). Die Tiere werden in Gruppen eingeteilt, von

45) Harris-Mills-Innes, Lancet 1932 II, 235. — Mills, Biochemic. J. 26, 704 (1923).

denen die eine als negative Kontrolle dient und unbehandelt bleibt, während eine andere eine bestimmte Dosis eines Standardpräparats erhält. Alle übrigen werden mit steigenden Dosen des zu untersuchenden Präparats behandelt.

Die Auswertung auf C-Gehalt erfolgt aus dem Gewichtsanstieg, wie aus einem Beispiel hervorgeht (Abb. 91).

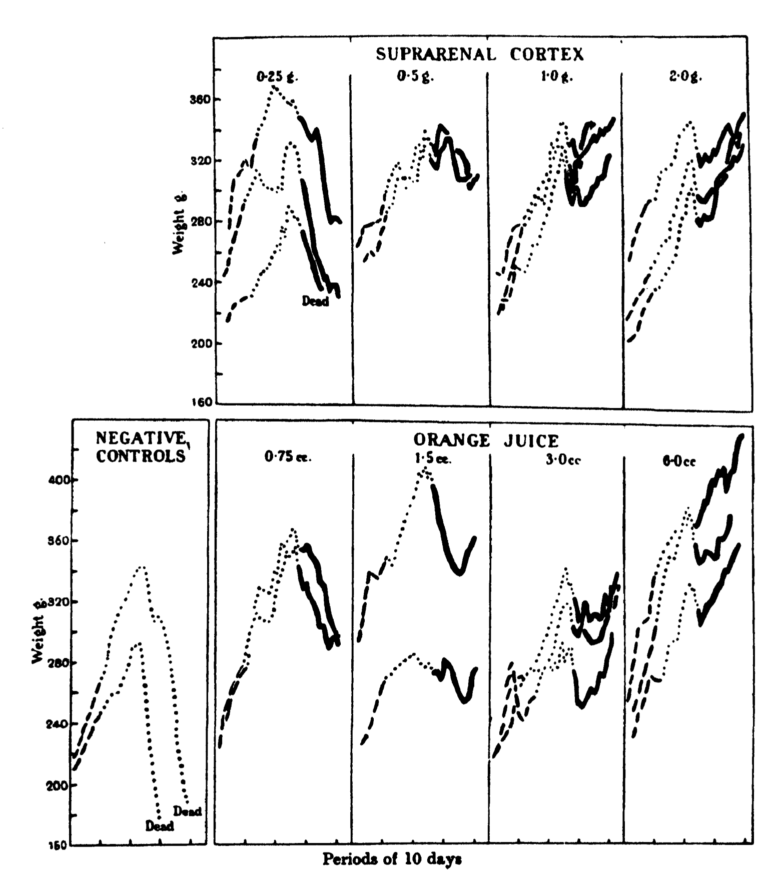


Abb. 91. Der Einfluß der Verabreichung verschiedener Dosen Nebennieren oder Orangensaft auf die Gewichtszunahme skorbutischer Meerschweinchen. (Gestrichelt = Vorperiode auf vollwertiger Kost, punktiert = Skorbutkost, ausgezogen = Zufütterungsperiode.) (Nach Harris c. s.)

Der Versuch wird nach 10 Tagen abgebrochen. Die Methode hat den Vorteil, schnell ausführbar und objektiv zu sein. Allerdings sind besondere Vorsichtsmaßregeln zu treffen, bevor man sie anwendet. Es müssen Tiere vorhanden sein, die eine bestimmte, nicht zu große Gewichtszunahme zeigen, da sonst die Ansprechbarkeit auf Vitamin C leidet. Andererseits können Tiere, die an interkurrenten Infektionen erkranken, die Auswertung erheblich stören.

Die Methode ist um so genauer, je mehr Tiere für die einzelne Dosis zur Verfügung stehen. Im allgemeinen kommt man mit 3—4 Tieren pro Dosis und mit 12—16 Tieren pro Substanz aus.

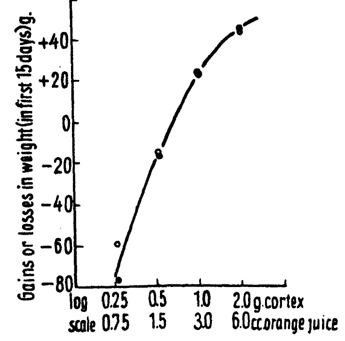


Abb. 92. Wirkung der Vitamin C-Verabreichung auf die Gewichtszunahme. (Nach Harris c. s.)

Die Auswertung kann auch aus folgender Abb. 92 erfolgen, indem man in dieser Standardkurve die der gefundenen Gewichtszunahme entsprechende Dosis abliest. Es ist zu bemerken, daß eine solche Kurve nur für ein und dieselbe Kost Bedeutung hat. Am besten wird sie mit genügendem Tiermaterial aufgestellt. Die Verwendung einer solchen Reaktionskurve berechtigt nicht dazu, die Kontrollversuche wegzulassen.

Harris-Mills-Innes (l. c. 45) empfehlen eine ähnliche Methode, die von der geschilderten nur durch die Kostmischung etwas abweicht. Sie verfüttern Haferflocken 3600 g, Kleie 400 g, Eigelb, trocken 200 g mit 1% Lebertran.

7. Beispiel nach Moll, Mercks Jahresberichte 1933. Auswertung von Zitronensaft und Ascorbinsäure. Kombination aller Methoden

Tabelle 97

Dosis in ccm	Zahl der Tiere	Anf.- Gewicht im Durchschnitt in g	Höchst- Gewicht im Durchschnitt in g	End- Gewicht im Durchschnitt in g	Zahl der Tiere m. pathologisch-anatomischen Skorbuterscheinungen a	b	c	d	Skorbutgesamtbild nach dem Zerlegungsbefund im Durchschnitt	Zahl der Tiere mit Skorbutveränderungen an den Schneidezahnwurzeln nach der Einteilung von Key u. Elphick 0	1	2	3	4	Skorbutgesamtbild nach dem Schneidezahnbefund im Durchschnitt
1. Behandelt mit Zitronensaft a) Rohsaft, b) dezitrierter Saft nach Zilva															
a) 3	4	322	468	468				4	fehlt				2	2	4
b) 3	6	339	451	451			2	4	sehr gering				1	3	4
a) 1,5	22	332	455	455			4	18	sehr gering		1	12	6	1	2/3
b) 1,5	9	340	451	451			3	6	gering			3	3		2/3
b) 1,0	3	344	479	479			1	2	gering		2	1			1/2
a) 0,75	5	354	454	445		2	2	1	leicht bis mittel-		5				1
a) 0,75	2	342	450	450			2		leicht		2				1
a) 0,5	2	350	461	445		2			mittel		2				1
b) 0,5	3	315	407	378		3			mittel		2	·1			1
2. Unbehandelte Kontrollen															
	45	325	378	214	44	1			schwer	36					0

Die unbehandelten Kontrollen sind in der Zeit vom 21.—32. Tag, im Durchschnitt am 27. Tag eingegangen. Die behandelten Tiere wurden getötet, nachdem die Kontrollen eingegangen sind. (30.—32. Tag.)

Zeichenerklärung: a = schwer, b = mittel, c = leicht, d = o. Bfd.

Tabelle 98

Dosis in mg und ccm	Zahl der Tiere	Anf.-	Höchst-	End- Gewicht im Durchschnitt in g	Zahl der Tiere m. pathologisch-anatomischen Skorbut-erscheinungen a	b	c	d	Skorbutgesamtbild nach dem Zerlegungsbefund im Durchschnitt	Zahl der Tiere mit Skorbutveränderungen an den Schneidezahnwurzeln nach der Einteilung von Key u. Elphick 0	1	2	3	4	Skorbutgesamtbild nach dem Schneidezahnbefund im Durchschnitt
I. Ascorbinsäure															
1. Peroral															
1,5 mg	2	312	430	430				2	fehlt				1	1	4
1,0 mg	3	327	509	509				3	fehlt			2	1		2/3
0,5 mg	6	313	473	473			2	4	sehr gering			6			2
0,25 mg	3	307	461	441		3			mittel		2	1			1/2
2. Subkutan															
0,5 mg	3	312	444	444				3	fehlt			1	2		2/3
0,05 mg	3	304	365	284		3			mittel	3					0
II. Kontrollen															
1. Frischer Zitronensaft															
1,5 ccm	5	329	486	486			1	4	sehr gering			5			2
0,75 ccm	2	326	417	400		2			mittel		2				1
2. Unbehandelt															
	8	314	381	225	8				schwer	8					0

Die unbehandelten Kontrollen sind in der Zeit vom 25.—32. Tag eingegangen, im Durchschnitt am 30. Tag. Die behandelten Tiere wurden getötet, nachdem die Kontrollen eingegangen sind. (31.—32. Tag.)

Zeichenerklärung: a = schwer, b = mittel, c = leicht, d = o. Bfd.

8. Weitere als Test vorgeschlagene Reaktionen 46), 47), 48), 49)

1. Die Erscheinung, daß die Nebennieren von Meerschweinchen eine Silberlösung reduzieren, wobei sie durch das ausfallende Silber schwarz gefärbt werden, während die Nebennieren skorbutkranker Tiere sich kaum färben, kann als Test auf Skorbut dienen. Bereits nach 6tägiger C-freier Fütterung enthalten die Nebennieren die reduzierende Substanz nicht mehr.

Die Reaktion hat für die quantitative Auswertung noch keine Bedeutung erlangt, kann aber als Zusatzprobe bei dem prophylaktischen Test mit verwandt werden 50).

2. Die Veränderungen an der Knorpel-Knochengrenze der Rippen können im Röntgenbild studiert werden und ebenfalls als Zusatzbefund bei der Stellung der Diagnose bewertet werden. Eine Methode, die allein auf der Röntgenoskopie fußt, ist zu ungenau.

3. Kollath 51) stellt die Diagnose aus dem histologischen Bild der Rippen. Nach dem Entkalken mit Müller-Formol und kurzer Nachbehandlung mit Salpetersäure werden die Rippen in Gelatine oder Celloidin eingebettet und geschnitten. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. Das histologische Bild bringt die verschiedenen Stadien deutlich zum Ausdruck.

4. Eine besonders einfache, aber nicht nachgeprüfte Methode beschreiben Dalldorf und Zall. Sie verwenden als Testreaktion auf Vitamin C nur das Zahn-

46) Siehrs c. s., Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 696 (1933).
47) Bourne, Austral. J. exper. Biol. a. med. Sci. 11, 261 (1933).
48) Moore-Ray, Nature (Lond.) 130, 997 (1932).
49) Dodd, Boston med. J. 169, 237 (1913).
50) De Caro, Boll. Soc. Biol. sper. 8, 1558 (1933).
51) Kollath, Arch. f. exper. Path. 167, 507 (1933).

wachstum, das, je nachdem C-Mangel oder genügende Zufuhr vorliegt, verlangsamt oder normal sein soll. 52)

5. Göthlin 53) betrachtet die Schädigung der Kapillarwände als Frühsymptom des C-Mangels und will durch Messung der relativen Widerstandsfähigkeit der Hautkapillaren gegen die Erhöhung des intravasalen Druckes eine Methode zur Bestimmung des C-Gehaltes eines Organismus aufbauen. Die Spezifität der Methode wird bezweifelt.

III. Die chemischen Methoden zum Nachweis des Vitamins C

Das Vitamin C ist ein auch in nicht alkalischer Lösung stark reduzierender Stoff, der z. B. Indophenolfarbstoffe zu farblosen Leukoverbindungen reduziert. Diese Eigenschaft wird für die chemische Bestimmung des Vitamins nutzbar gemacht. Als spezifisch reduzierbar durch das Vitamin C erwies sich das 2,6-Dichlorphenolindophenol (Schuchardt).

Die Reaktion ist in Gegenwart von gelösten Eisensalzen nicht durchführbar und auf tierische Organe nicht anwendbar. Das einzige pflanzliche Material, das falsche Werte ergibt, sind Pfifferlinge.

Die von Bezssonoff als Reaktion auf das Vitamin C vorgeschlagene Reaktion mit dem Folin-Denis-Reagens ist für das Vitamin nicht spezifisch.

Die 2,6-Dichlorphenol-Indophenolmethode der Vitamin C-Bestimmung

1. Methodik von Tillmanns-Hirsch-Jakisch

Die Titration wird in schwach saurer Lösung mit 2-6-Dichlorphenol-indophenol ausgeführt. Es wird auf Blau titriert.

In stark saurer Lösung ist der Indikator nicht blau, sondern rot.

Einstellung der Indikatorlösung gegen Titantrichlorid

Die Titanlösung wird stets frisch hergestellt aus einer käuflichen 15%igen salzsäurehaltigen Lösung.

Man stellt zunächst die Titanlösung gegen eine 0,01 n Eisenlösung auf 0,01 n ein. Dazu löst man 4,8221 g $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ in einer 0,02 n Schwefelsäure zu 1 Liter.

5 ccm dieser Lösung werden mit 5 ccm Schwefelsäure 1 : 3 und 5 ccm 10%iger Rhodankaliumlösung versetzt und mit der etwa 0,01 n Titanlösung auf farblos titriert.

Die Einstellung der Farblösung gegen die Titanlösung geschieht durch Titration von 20 ccm der etwa 0,001 n 2-6-Dichlorphenollösung (die man mit wenig Essigsäure bis zur Rotfärbung und dann mit soviel festem Natriumacetat versetzt, bis die Farbe in Blau umschlägt und auch während der folgenden Titration blau bleibt), gegen die Titanlösung auf farblos. Der Natriumacetatzusatz muß so bemessen sein, daß auch die saure Titanlösung abgepuffert wird.

Einstellung der Indikatorlösung gegen Ferrosalz

Man löst Mohrsches Salz in einer schwach schwefelsauren Lösung unter Stickstoff zu einer 0,01 n Lösung.

Ein bestimmtes Volumen wird mit Natriumoxalat im Überschuß versetzt und schnell mit der Farblösung titriert, bis die Lösung blau wird. Die Titration muß bei gedämpftem Licht ausgeführt werden. Schnelles Arbeiten ist erforderlich, da die Lösung nachblaut.

---

52) Dalldorf-Zall, J. of exper. Med. 52, 57 (1930).

53) Göthlin, J. alb. a. clin. Med. 18, 484 (1933); Skand. Arch. Physiol. 65, 24, (1932); Klin. Wschr. 1932, 1469; Determination of the antiscorbutic potency usw. Stockholm 1933.

Gewinnung der vitaminhaltigen Lösung aus den Nahrungsmitteln

Früchte werden mit der Fruchtpresse gequetscht und der Saft titriert. Gemüse wird zerkleinert, mit Wasser oder Säure ausgekocht und die Titration mit dem Extrakt vorgenommen.

Man zerschneidet die zu untersuchende Substanz (Achtung vor Eisen, nur Nirosta-Messer!) und bewahrt sie mit der mehrfachen Wassermenge im Eisschrank einen Tag unter Stickstoff auf.

Der Rückstand wird mit etwa 2—3%iger Schwefelsäure unter denselben Bedingungen behandelt. Der dann verbleibende Rückstand wird mit Wasser 10 Minuten unter Durchleiten von Stickstoff gekocht und schnell gekühlt. Dieselbe Operation wird mit dem Rest unter Säurezusatz vorgenommen.

Die Extrakte werden durch ein Tuch abgepreßt, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, und ein Teil für die Titration verwendet. Bei sauren Extrakten stumpft man den Hauptteil der Säure durch Natronlauge ab und versetzt dann mit festem Natriumacetat. Man titriert, bis die blaue Färbung auch einige Minuten bestehen bleibt.

Die Farblösung wird mit Phosphatpuffer vom $p_H = 7$ hergestellt. Die Titration kann nicht bewertet werden, wenn gegen Ende die Entfärbung nur schleppend vonstatten geht, wie es bei einigen Nahrungsmitteln der Fall ist (Weintraube, Lauch).

Im allgemeinen gibt die Schwefelsäurekochung die höchsten Titrationszahlen. Sie genügt in den meisten Fällen, da die erhaltenen Werte die Summe aller anderen bilden.

Auswertung der Ergebnisse

Man errechnet die Anzahl Kubikzentimeter der Farblösung, die von 10 g der zu untersuchenden Substanz reduziert werden und nennt diese Zahl = TW (Titrationswert).

Die einzelnen Nahrungsmittel vergleicht man durch eine VZ (Vergleichszahl), die angibt, wieviel Kubikzentimerter Farblösung von der Tagesdosis des Meerschweinchens reduziert werden:

$$VZ = \frac{TW}{\text{ME. (Meerschweincheneinheit)}}$$

Ein Beispiel wird im folgenden gegeben:

Tabelle 99 (nach Tillmanns)

Wir benutzten bei der Wiedergabe der Titrationsergebnisse folgende Abkürzungen:

FL	= Farblösung	FKA	= Folgender Kochauszug
J	= Jodlösung	WKA	= Erster wäßriger Kochauszug
WA	= Kalter wäßriger Auszug	FWKA	= Folgende wäßriger Kochauszüge
SA	= Kalter Säureauszug	SKA	= Säurekochauszug.

Einige Beispiele sollen die Art unserer Angaben näher erläutern.

Es wurden 50 g Grünkohl mit 200 ccm Wasser 24 Stunden lang kalt ausgezogen und danach die Flüssigkeit abgepreßt. Von den 200 ccm Preßflüssigkeit reduzierten 40 ccm, entsprechend 10 g Kohl, 7 ccm 0,001 N.-FL also WA = 7.

Nun wurde der Rest (entsprechend 50 g Kohl) mit 200 ccm Wasser gekocht, die Preßflüssigkeit auf 200 ccm ergänzt und titriert. 4 ccm reduzierten 13,2 ccm FL. Von dem darauffolgenden Kochauszug mit abermals 200 ccm Wasser reduzierten 40 ccm, entsprechend 10 g Kohl, 18 ccm FL. Die beiden Kochungen wurden dann als Summe angegeben; also FKA = 132 + 18 = 150.

In ganz derselben Weise sind die übrigen Angaben der folgenden Übersicht zu verstehen, welche für 3 verschiedenartige pflanzliche Lebensmittel die erhaltenen Titrationszahlen im einzelnen wiedergibt.

Tabelle 100. Grünkohl
(50 g Grünkohl + 200 ccm Wasser bzw. Säure)

Wasser		Säure	
Kalter Auszug 7,	WA = 7	163,	SA = 163
1. Kochung 132 2. „ 18	FKA = 150	33 7	FKA = 40
1. Kochung 124,	WKA = 124	139 16 0	SKA = 155
2. „ 10 3. „ 0	FWKA = 10		

Tabelle 101. Kohlrübe
(100 g Kohlrübe + 200 ccm Wasser bzw. Säure)

Wasser		Säure	
Kalter Auszug 1 (3),	WA = 1	25 (27),	SA = 25
1. Kochung 21 (24) 2. „ 5 (7) 3. „ 1 (1)	FKA = 27	18 (18) 4,5 (5) 0,5 (1)	FKA = 23
1. Kochung 16 (25)	WKA = 16	27 (36) 13 (14) 2 (2)	SKA = 42
2. „ 6,5 (10) 3. „ 0,5 (2)	FWKA = 7		

Tabelle 102. Pfirsich
(50 g Pfirsich + 200 ccm Wasser bzw. Säure)

Wasser		Säure	
Kalter Auszug 3,	WA = 3	6	SA = 6
1. Kochung 3 2. „ 0	FKA = 3	4 0	FKA = 4
1. Kochung 5	WKA = 5	10 1 0	SKA = 11
2. „ 2 3. „ 0	FWKA = 2		

Die Oxydation der Farblösung ist reversibel. Man kann durch Einleiten von Schwefelwasserstoff den Vorgang rückgängig machen.

Die Methode versagt bei eisenhaltigen Konserven. Die kleinen Eisenmengen, die in den Pflanzen vorkommen, stören nicht.

2. Die Methode von Siebert 54)

Siebert vervollständigt die Tillmannssche Methode, insofern als er eine Modifikation ausarbeitet, die auch für gefärbte Fruchtsäfte usw. anwendbar ist.

In einem Zentrifugenrohr von 1,5 cm lichter Weite werden 5 ccm Nitrobenzol mit der zu titrierenden Lösung überschichtet, die vorher mit wenig Essigsäure angesäuert wurde. Man läßt zunächst (ohne zu schütteln) die Farblösung aus der Bürette zufließen, wobei das Glas leicht umgeschwenkt wird. Erst dann schüttelt man etwas. Sollten sich dabei die Schichten nicht wieder trennen, wird zentrifugiert.

54) Siebert, Dissertation. Frankfurt a. M. 1931.

Man erkennt den Umschlag an der Farbänderung des Nitrobenzols von grünlich-gelb nach rötlich-gelb.

Die Methode beruht auf Unlöslichkeit der Pflanzenfarbstoffe in Nitrobenzol, in dem die Farblösung im Überschuß löslich ist.

3. Methode von Bleyer-Schlemmer-Cahnmann 56)

25 ccm Milch werden im Erlenmeyer mit 10 ccm 10%iger neutraler Bleiacetatlösung ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$), dann mit 15 ccm 20%iger $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ gefällt. Nach jeder Zugabe wird gut umgeschüttelt und schließlich durch ein Filter (Schleicher-Schüll 560) filtriert. Das Serum muß klar sein.

Man läßt zu der Lösung aus einer Bürette solange 2—6-Dichlorphenolindophenollösung zufließen, bis Blaufärbung erfolgt. Das p_H muß 5,5—6,5 betragen (Einstellung mit 1%iger Essigsäure). Die Lösung des 2—6-Dichlorphenolindophenols wird gegen Titanlösung und Ferrilösung eingestellt (s. oben). Man führt die Titration am besten in kleinen weißen Porzellanschalen aus, da hier der Umschlag besser zu sehen ist. Die Titration dauert 3—5 Minuten. Die Natriumsulfatlösung wird 2 Minuten nach der Bleilösung zugegeben. Nach 2—3 Minuten wird filtriert, die Filtration dauert etwa 15 Minuten.

Die Ergebnisse betragen bei Milch etwa 20—25 ccm pro 100 ccm. Eselsmilch braucht 150—170 ccm, Schafmilch nur 3—4 ccm, Ziegenmilch 15—30 ccm, Frauenmilch 90—110 ccm.

Kieferle und Mitarbeiter 57) untersuchen die Beeinflussung des C-Gehalts der Milch bei der technischen Verarbeitung und finden gute Übereinstimmung mit dem biologischen Test.

Wolff-Eckelen-Emmerie 58), die nach der Methode von Tillmanns mit 2,6-Dichlorphenolindophenol arbeiteten, zeigten, daß 1 mg Ascorbinsäure 16,4 ccm Reagens entspricht. 1 g Nebenniere vom Kaninchen brauchte 23 ccm Reagens und 1 g Nebenniere vom Menschen 1,2 ccm.

Nach Karrer-Euler-Hellström 59) verbraucht 1 mg Ascorbinsäure 15,5 ccm der Farblösung, 1 ccm Zitronensaft etwa 5,5 cm Indikator.

Wolff 60) fand mit einer Lösung von 500 mg 2,6-Dichlorphenolindophenol pro Liter für 1 mg Ascorbinsäure einen Verbrauch von 10,65 ccm, während von 1 ccm Zitronensaft 5,5 ccm reduziert wurden.

Die Bestimmung geschah durch Verreiben von 1 g Material (Organ) mit eisenfreiem Quarzsand und 5 ccm 5%iger Trichloressigsäure. Das Filtrat wird mit der Farblösung auf Rot titriert.

4. Die Methode von Harris-Ray und Mitarbeiter

Harris und Ray 61) wenden die Tillmannssche Methode an. Sie standardisieren aber ihre Indikatorlösung gegen ein bekanntes Hexuronsäurepräparat (Hexuronsäure im folgenden = Ascorbinsäure). Den Gehalt dieses Präparats an wirklicher Hexuronsäure ermitteln sie durch Titration mit Jod. Ein Molekül Hexuronsäure verbraucht 2 Atome Jod. Sie können auf diese Weise sofort die

56) Bleyer-Schlemmer-Cahnmann, Biochem. Z. 254, 187 (1932). — Bleyer, Münch. med. Wschr. 1933, 257.

57) Kieferle, Ber. Physiol. 75, 92 (1933).

58) Wolff-Eckelen-Emmerie, Acta brev. neerl. Physiol. 3, 44 (1933).

59) Karrer-Euler-Hellström, Arch. Kemi. Meneral. o. Geolog. 11 B, 6 (1933).

60) Wolff, Med. Tidskr. Genesk. 1933, 2140.

61) Harris-Ray c. s., Biochemic. J. 27, 302, 590 (1933).

für eine Substanz verbrauchten Kubikzentimeter Titrationslösung auf Hexuronsäure umrechnen und den Gehalt der Substanz an Hexuronsäure angeben.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Titration in saurer Lösung, wodurch das störende Glutathion ausgeschaltet wurde.

Herstellung der Titrationslösung: Man löst 0,1 g 2,6-Dichlorphenolindophenol in wenig kochendem Wasser und gießt die Flüssigkeit in einen 50-ccm-Meßkolben. Das Unlösliche wird in derselben Weise nochmal behandelt. Die Lösung wird auf 50 ccm aufgefüllt. Sie ist stets frisch zu bereiten, da sonst der Endpunkt der Titration unscharf wird.

Ausführung der Bestimmung: Die zu untersuchende Substanz wird abgewogen und mit Sand unter Zusatz von Trichloressigsäure (20 %iger) gemahlen. Man nimmt dabei eine solche Menge Trichloressigsäure, daß nachher die Lösung 5 %ig wird. Man verreibt die Mischung und füllt auf ein bestimmtes Volumen auf. Zitronensaft verdünnt man z. B. auf 1 : 10.

Die Lösung wird filtriert in eine Mikrobürette gefüllt.

Man nimmt ein bestimmtes Volumen der Phenollösung und läßt aus der Bürette solange die unbekannte Lösung zufließen, bis die rote Farbe eben verschwindet. Die Titration muß in 2—3 Minuten beendet sein.

Einstellung der Indikatorlösung: Man titriert ein Hexuronsäurepräparat in genau derselben Weise auf Umschlag in farblos oder gelblich.

Die Hexuronsäurelösung wird darauf gegen Jod eingestellt.

Auf diese Weise ermittelt man die Kubikzentimeter der Titrationslösung, die 1 mg Hexuronsäure entsprechen. Ein Beispiel geht aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle 103. Standardisation of hexuronic acid against iodine, and indicator solution against hexuronic acid

10 cc. of hexuronic acid solution (containing 1,72 mg. of a specimen of hexuronic acid) were titrated —

(1) against 0,00677 N iodine solution:
I required = 2,31 mg.;
Hence hexuronic acid present = 1,60 mg.;

(2) against indicator solution:
Volume of indicator required = 2,7 cc.
Hence, 2,7 cc. of indicator solution = 1,6 mg. of hexuronic acid
or, 1 cc. „ = 0,6 mg. „

Das p_H der zu untersuchenden Lösung (Trichloressigsäurefiltrat) muß etwa 2,5 betragen, da bei dieser Reaktion die besten Werte erhalten wurden.

Die Methode versagt bei Autolysaten, die Cystin enthalten. Auch Hefe enthält eine störende Substanz.

Die Auswertungen ergaben für 2 ccm Orangensaft eine Hexuronsäuremenge von 1,2 mg.

Die nach der Methode als Tagesdosis für das Meerschweinchen ermittelten Werte stimmen mit dem im Testversuch gefundenen gut überein, wie aus nebenstehender Tabelle hervorgeht.

Kon **62)** wandte die Methode zur Bestimmung des Vitamins C in der Milch an. v. Euler **62a)** berichtet nach einer ähnlichen Methode über den C-Gehalt verschiedener Organe.

---

62) Kon, Nature (Lond.) 1933, 64.
62a) v. Euler, Ark. Kemi. Minerl. och Geolog. 11 B, Nr. 18 (1933).

Tabelle 104

	Hexuronic acid content mg. per g.	Minimum daily dose for guinea-pigs, g.	
		As calculated from hexuronic acid chemically determined	As measured biologically (newly determined or reputed value)
Cabbage	1,0	0,9	1
Watercress	0,67	1,3	1
Lemon juice	0,62 0,60	1,5 1,5	1,5
Orange juice, several types	0,75 0,59 0,48	1,2 1,5 1,9	1,5
Grape-fruit juice of	0,65 0,59	1,4 1,5	1,5—2
Pineapple juice	0,30	3	2—3
Imported tomato, juice of	0,21	4,3	3—5
Banana	0,15	6	5—10
Potato	0,15	6	6—10
Rhubarb	0,059	15	12
Carrots	0,028	32	10—35
Grapes	<0,030	>30	>20, 40
Imported peach, juice of	0,015	60	—
Horse-radish	1,6	0,6	—
Apples:			
Bramley's Seedling, cortex	0,16	5,5	3—5
„ peel	0,77	1,2	1
Newton Wonder, cortex	0,053	17	10
„ peel	0,24	3,7	3
Blenheim Orange, cortex	0,031	29	—
„ peel	0,33	2,7	—
Edward VII, cortex	0,017	53	>20
„ peel	0,12	7,5	2 ?
Cox's Orange Pippin, cortex	0,016	56	>20
„ peel	0,09	10	—
Suprarenal cortex, ox	1,85	0,5	0,5
Liver, ox	0,68	1,3	—
Milk, cow's (variable)	0,025—0,019	36—47	20—60
"Ostomalt"	0,27	3,3	4
Egg-yolk	0,00	∞	∞
Sussex ground oats	0,00	∞	∞

5. Die C-Bestimmung im Blut nach der Reduktionsmethode

van Ekelen und Mitarbeiter **63)** beschrieben die C-Bestimmung im Blut nach dem Tillmannschen Verfahren. Man enteiweißt mit Trichloressigsäure und erhält nach der Reduktion mit Schwefelwasserstoff viel größere Reduktionswerte als vorher. Die vorhandenen C-Mengen sind so gering, daß sie die Zuckerbestimmung nicht stören können.

Die Methode ist nicht ganz durchsichtig und mit Vorsicht zu handhaben.

van Eckelen c. s. **63)** fanden eine Reduktion des Farbstoffs in saurer Lösung auch durch Cystein und Ergothionein. Glutathion reduziert nicht in saurem Milieu. Emmerie fällt Cystein und Ergothionein mit Quecksilberacetat, während die As-

63) van Eckelen-Emmerie c. s., Acta brev. Neerl. Physiol. 3, 104 (1933); Nature (Lond.) 1933, 315; Biochemic. J. 1934; Klin. Wschr. 1934, 564.

corbinsäure in reversibel oxydierter Form in Lösung bleibt und durch Schwefelwasserstoffbehandlung zurückgewonnen werden kann. Es wurden folgende Werte gefunden, aus denen hervorgeht, daß die bisherigen Werte zu hoch sind, da nach der Hg-Behandlung nur ein kleiner Teil der Reduktionskraft erhalten bleibt.

Tabelle 105. Analysen

	Verbrauchte ccm Indikator *) pro 10 ccm Flüssigkeit		
	evtl. nach Enteiweißen mit CCl_3COOH	nach Reduktion mit H_2S	nach Fällung mit $Hg(CH_3COO)_2$
Blut (Kuh)	0	2,73	0,53
Plasma	0,5	1,71	0,53
Blutkörperchen	0	3,78	0,72
Augenkammerwasser	1,68	1,84	1,80
Cerebrospinalflüssigkeit	3,00	3,00	3,00
Harn	3,00	3,30	1,30

6. Die Bestimmung des Vitamins C im Urin

Die C-Bestimmung im Urin kann nach zwei Methoden erfolgen, erstens durch Titration mit n/100 Jodlösung in stark saurem Milieu, zweitens durch Titration mit 2-6-Dichlorphenol-Indophenol. Ascorbinsäure entfärbt Jodlösung innerhalb weniger Sekunden (max. 10). 1 ccm n/100 Jodlösung entspricht 0,88 mg Ascorbinsäure. Die 2-6-Dichlorphenol-Indophenollösung wird zweckmäßig gegen reine Ascorbinsäure eingestellt. Die Ergebnisse beider Methoden sind kritisch zu betrachten, da sie bei Anwesenheit gewisser Begleitstoffe, wie Gluthathion, Phenolen, Ergothionein usw., mit Unsicherheiten behaftet sind. Die Titration mit 2-6-Dichlorphenol-Indophenol wird weniger durch Begleitstoffe gestört als die Jodtitration, die für rasches Arbeiten zweckmäßiger ist.

Titration von Ascorbinsäure im Urin. 25 ccm werden nach Zusatz von 5 ccm Schwefelsäure (16 %ig) und 0,5 ccm Stärkelösung (1 %ig) mit n/100 Jodlösung bis zur Blaufärbung titriert. Bei unscharfem Umschlagspunkt wird besser ein geringer Überschuß der Jodlösung zugegeben und nach 15 Sekunden mit n/100 Thiosulfatlösung zurücktitriert. Die n/100 Lösungen werden aus n/10 Lösungen frisch hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt. Der Titer ist öfter zu kontrollieren. Wichtig ist die Titration des möglichst frischen Harns.

Die Reduktionskraft des normalen Urins beträgt für 25 ccm etwa 0,5 bis 3 ccm n/100 Jodlösung. Die tägliche normale Ausscheidung des Erwachsenen im Harn beträgt etwa 30—33 mg (Harris-Ray-Ward 64a)) Ascorbinsäure.

7. Kritik der chemischen Bestimmung des Vitamins C

Die zur chemischen C-Bestimmung vorgeschlagenen Methoden sind nicht spezifisch. Es gibt außer dem Vitamin C und in verschiedenen Lösungen neben diesem Substanzen, die dieselbe Reaktion zeigen und die Bestimmung erheblich stören können. v. Euler 64) konnte zeigen, daß aus Zucker bei Behandlung mit Alkali ähnliche stark reduzierende Stoffe gebildet werden.

Harris 65) fand die Methode nicht anwendbar auf Malzextrakte und auf cystinhaltige Stoffe. Trotzdem wird man aber bei genauer Kenntnis der

*) 1 mg Ascorbinsäure entfärbt 11,0 ccm Indikator.

64) v. Euler, Naturwiss. 1933, 236.

64a) Harris c. s., Biochemic. J. 27, 2011 (1933), 26, 1624 (1932).

65) Harris, Nature (Lond.) 1933, 27.

Störungsmöglichkeiten und Einhaltung der Vorschriften mit der chemischen Vitaminbestimmung zu vergleichbaren Ergebnissen gelangen können. Es wird aber unumgänglich sein, nach wie vor eine genaue Standardisierung am Tier vorzunehmen.

Bei sehr großem Titrationswert kann z. B. die biologische Wirkung der untersuchten Substanz minimal sein (!!!).

IV. Der Vitamin C-Standard

Als eine internationale Einheit des Vitamins C gilt vorläufig 0,1 ccm eines nach folgender Methode behandelten Zitronensaftes:

Ausgepreßter Zitronensaft wird durch Gaze filtriert, mit Kalziumkarbonat im Überschuß versetzt, nach einstündigem Stehen filtriert. Der p_H der Lösung beträgt etwa 6,0. Die Wirkung 1 ccm dieser Lösung ist außerordentlich konstant.

Nach Angaben der Literatur soll sich als Standard Apfelsinensaft besser eignen als Zitronensaft, doch ist dieser Standard international nicht anerkannt.

10 internationale Einheiten entsprechen etwa 1 Meerschweincheneinheit.

1 Meerschweincheneinheit ist etwa identisch mit einer Substanzmenge, die 7 ccm Indophenolreagens reduziert.

Die internationale Vitaminkonferenz des Völkerbundes London 1934 hat einen neuen C-Standard eingeführt, und zwar gilt danach als eine Einheit die Wirkung von 0,05 mg reiner l-Ascorbinsäure, die in ihrer Wirkung etwa 0,1 ccm Zitronensaft entspricht **66)**.

V. Die Bildung des Vitamins C

Vitamin C wird von der Pflanze gebildet. Licht und Chlorophyll sind hierfür nicht erforderlich. Licht beschleunigt aber die Vitamin C-Synthese. Bei der Keimung entsteht das Vitamin ebenfalls. Das konnte sowohl für Getreidesamen als auch für Leguminosen bestätigt werden. Erfolgt die Keimung in säurehaltigem Wasser, so ist die Bildung des Vitamins beschleunigt. Weizen, Roggen und Gerste bilden schon nach 24 Stunden reichliche Mengen C-Vitamin. Hafer erst nach 72—96 Stunden. Bei der Reifung von Früchten entsteht das Vitamin C in größerer Menge.

Die bakterielle Synthese ist für Vitamin C noch nicht erwiesen.

Ob Tiere, die ohne C-Zufuhr leben können (Ratten, Hühner usw.) zur C-Synthese befähigt sind, läßt sich nicht entscheiden. Immerhin ist die Tatsache bemerkenswert, daß Ratten, die C-frei ernährt werden, noch Vitamin C in der Leber speichern. Selbst bei den Jungen dieser Tiere findet man in der Leber das Vitamin.

VI. Die Speicherung des Vitamins C

Die Speicherung des Vitamins C ist erwiesen. Sie erfolgt allerdings nicht in einem solchen Ausmaß, wie wir es etwa vom Vitamin D oder A her kennen. Im allgemeinen sind die C-Vorräte des Meerschweinchens in 14—20 Tagen erschöpft. Parsons und Reynolds fanden in Leber skorbutischer Tiere kein Vitamin C.

66) Lancet 1934, 45.

Die Vordiät der Versuchstiere für den Vitamin C-Test spielt keine große Rolle bei der Entstehung des Skorbuts. Im allgemeinen entwickeln aber Tiere mit einem Gewicht von 200—300 g eher Mangelsymptome als jüngere oder ältere, da jene von der Mutter her einen großen Vorrat an C haben und diese durch die Vordiät Vitamin C speichern.

VII. Der Vitamin C-Bedarf

Fast die gesamten untersuchten Tiere, bis auf Meerschweinchen, können ohne C-Zufuhr normal gedeihen. Erwachsene Kaninchen benötigen das Vitamin nicht, doch scheint es für junge unentbehrlich zu sein. Ratten und Mäuse können jahrelang ohne C-Zufuhr wachsen und sich fortpflanzen. Wiederkäuer scheinen zur C-Synthese befähigt zu sein, da z. B. Kühe auch bei vollkommen C-freier Kost eine C-haltige Milch liefern.

Tauben, Hühner und Kücken (?) benötigen das Vitamin nicht. Kücken scheinen das Vitamin C ebenfalls synthetisch aufbauen zu können (vgl. dagegen oben). Die Leber der Kücken enthält auch nach langer C-freier Ernährung noch reichliche Vitaminmengen. Ratten verhalten sich ebenso.

Der C-Bedarf ist beim Meerschweinchen ein besonders hoher, da ein Meerschweinchen von 300—400 g dieselbe C-Menge benötigt wie etwa ein Affe mit einem Gewicht von 2—3 kg.

Der Bedarf des Menschen an Vitamin C ist 50mal größer, als der des Meerschweinchens.

VIII. Das Vorkommen des Vitamins C

Tabelle 106

Substanz	Prophylaktische Meerschweinchendosis in g oder ccm	Substanz	Prophylaktische Meerschweinchendosis in g oder ccm
Zitronensaft	1—1,5	Milch, roh	20—150
Limonensaft	2,5—5,0	Eier	0
Apfelsinensaft	1,5	Milch, kurz im offenen Becher zum Sieden erhitzt	40—300
Apfelsinenschale	1—2	Muskelfleisch	Nicht nachweisbar
Mandarinensaft	2,0	Leber	Eben nachweisbar
Pampelmusesaft	1,0	Getreidekörner	Spuren
Tomate, rot	1,5—5,0	Getreidekörner und Leguminosen gekeimt oder in Wasser längere Zeit gequollen	Reichlich C-haltig
Tomate, grün	Erheblich mehr		
Tomatensaft	0,5—4,0		
Bananen	5—10		
Pfirsich	5		
Apfel	10—15		
Birne	10—15		
Ananassaft	2,5		
Kürbissaft	15—20		
Gras, Leguminosen, grün, Zuckerrübenblätter	1—5		
Kohl, Salat, Spinat	1—2		
Karotten, Möhren	20—40		
Karottenpreßsaft	20		
Kartoffel	3—4		
Rüben	2,5		

IX. Die chemische Natur des Vitamins C

Von besonderer Bedeutung bei der Isolierung des Vitamins C wurde die Erscheinung, daß C-haltige Stoffe im allgemeinen eine der C-Wirksamkeit parallelgehende Reaktionswirkung entfalten (Tillmanns c. s. 68)). Während aber Zilva 69) aus seinen Versuchen schloß, daß die reduzierende Substanz vom Vitamin verschieden sei, konnte Tillmanns den Beweis der Identität beider erbringen. Es gelang ihm außerdem zu zeigen, daß bei der Oxydation des Vitamins zunächst ein primäres Oxydationsprodukt entsteht, das noch antiskorbutisch wirksam ist und sich in das Vitamin rückverwandeln läßt. Erst bei weiterer Oxydation entsteht ein nicht mehr C-wirksames Produkt. Bereits 1928 war Szent-Györgyi 70) bei der Untersuchung der Nebennierenrinde auf eine ganz ähnliche Substanz gestoßen, die er Hexuronsäure nannte und deren Identität mit dem C-Vitamin in der Folgezeit bewiesen wurde. Die Ermittlung der Konstitution des Vitamins konnte aber erst in Angriff genommen werden, als Szent-Györgyi in den Paprikaschoten eine außerordentlich reichhaltige C-Quelle entdeckte. Durch die Arbeiten von Cox und Hirst 71), Karrer 72) und Micheel 73) wurde schließlich für das Vitamin C die Formel $C_6H_8O_6$ folgender Konstitution sichergestellt:

```
        HO         O
          \       //
           C —— C
          //  H   \
   HO — C     |    O
          \   |   /
            C
            |
      HO — C — H
            |
           CH₂OH
```

Die Substanz wird Ascorbinsäure genannt. Die natürlich vorkommende C-wirksame Form ist die l-Ascorbinsäure, die heute in verschiedenen Betrieben durch Synthese gewonnen wird.

X. Die Darstellung Vitamin C-haltiger Konzentrate

1. Methode von Hoyle-Zilva 74): Apfelsinensaft wird mit einem Überschuß von gefälltem Calciumcarbonat versetzt, gerührt und nach 1stündigem Stehen filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum bei höchstens 50° auf $^1/_5$ eingeengt. Man versetzt die Lösung mit ½ des Volumens an absolutem Alkohol und verwirft den Niederschlag. Das Filtrat wird im Vakuum vom Alkohol befreit. Die Lösung ist haltbarer, wenn sie mit Zitronensäure schwach angesäuert wird.

2. Methode von Zilva: Man engt dezitrierten Apfelsinensaft oder Zitronensaft auf $^1/_{10}$ des Volumens ein und setzt pro Liter Saft 7 g reine Zitronensäure zu. Die Lösung ist sehr haltbar.

68) Tillmanns c. s., Biochem. Z. 250, 312 (1932).
69) Zilva c. s., Biochemic. J. 18, 633 (1924); 21, 698 (1927); 23, 1199 (1929).
70) Szent-Györgyi c. s., Biochemic. J. 22, 1387 (1928); 27, 278 (1933); Nature (Lond.) 576, 690 (1932).
71) Cox-Hirst, Nature (Lond.) 130, 888 (1932); Chem. a. Ind. 52, 221 (1933).
72) Karrer c. s., Biochem. Z. 258, 4 (1933); Helvet. chim. Acta 16, 302 (1933).
73) Micheel c. s., Nature (Lond. 131, 274 (1933); Z. physiol. Chem. 215, 215 (1933); 216, 233 (1933).
74) Hoyle-Zilva, Biochemic. J. 21, 1121 (1927).

XI. Die Darstellung des Vitamins C in kristallisierter Form

1. Methode von King und Mitarbeiter 75)

Anhand der Methoden von Grettlie-King-Waugh usw. haben neuerdings King und Mitarbeiter eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, das Vitamin C aus Zitronensaft mit einer Ausbeute von 100—150 mg pro Liter in reiner Form zu gewinnen.

3 Liter Zitronensaft werden durch Gaze filtriert, mit 7 g basischem Bleicarbonat ($2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$, kupferfrei!) pro 100 ccm versetzt und 3 Stunden gerührt. Die Lösung wird mit einer gesättigten Lösung von neutralem Bleicarbonat (etwa 500 ccm für 3 Liter) versetzt und weitere 30 Minuten gerührt. Dann wird der Niederschlag abzentrifugiert.

Das klare Filtrat wird auf 0° abgekühlt und während dieser Zeit Kohlendioxyd hindurchgeleitet. Verdünntes Ammoniak (1 : 3) wird zugesetzt, bis die Lösung $p_H = 7{,}6$ zeigt (Phenolrot). Der ausfallende gelbe Niederschlag, der das Vitamin C enthält, wird in Essigsäure 1 : 3 gelöst und nochmals durch Zugabe von Ammoniak bei $p_H = 7{,}6$ gefällt. Bleiben die Filtrate gelb, so enthielt die Lösung entweder zu wenig Ammoniak oder zu wenig Bleiacetat. Der umgefällte Niederschlag wird in Salzsäure 1 : 1 gelöst. Die Reaktion muß deutlich kongosauer sein. Die Lösung wird zwecks Entfernung der Fette usw. mit dem halben Volumen n-Butylalkohol ausgeschüttelt. Die wäßrige Schicht versetzt man mit Alkohol zu einer Konzentration von 75 %.

Die Lösung wird zentrifugiert. Der Niederschlag besteht zum größten Teil aus Bleichlorid. Die Lösung wird auf 10 ccm eingeengt (Vakuum, Temperatur nie über 40°! Alle Operationen unter CO_2 durchführen!) und mit 100 ccm Aceton versetzt.

Der Niederschlag, der meist aus anorganischen Salzen besteht, wird entfernt, das Filtrat mit Bariumcarbonat neutralisiert, mit 5 g feinem Seesand versetzt und zur Trockne verdampft (Vorsicht, s. oben!).

Der Rückstand wird mit 15 ccm trockenem Benzol ausgezogen und die Lösung verjagt. Der Rückstand wird mit 200 ccm absolutem Benzol gut bedeckt, über Nacht stehen gelassen.

Das klare Filtrat wird abzentrifugiert, zur Trockne verdampft und mit 30 ccm eines absoluten n-Propylalkohols aufgenommen. Nach Abkühlung auf 0° wird die Lösung mit demselben Volumen Petroläther (30—60°) versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und zum Filtrat weitere 60 ccm Petroläther gegeben. Der entstehende Niederschlag wird ebenfalls abzentrifugiert.

Die Lösung wird bei 0° aufbewahrt.

Die beiden Niederschläge werden getrennt nacheinander mit 25 ccm n-Propylalkohol 10 Minuten bei Zimmertemperatur extrahiert und die Lösung wieder durch Zugabe von 75 ccm Petroläther gefällt.

Diese beiden Filtrate werden mit dem obigen vereinigt, zur Trockne verdampft, mit 15 ccm absolutem Benzol aufgenommen und wieder verdampft.

Der Rückstand wird im kleinsten Volumen n-Propylalkohol gelöst und mit Petroläther versetzt, bis eben eine beginnende Fällung erscheint. Die Lösung wird im Exsikkator über Phosphorpentoxyd im Eisschrank der Kristallisation überlassen, die meist nach 24 Stunden vollständig ist. Bei unvollständiger Kristallisation wird der Alkohol im Vakuum weiter abgedampft.

Die Kristalle werden aus Methanol umkristallisiert. Sämtliche Lösungen müssen absolut trocken sein. Vorsicht vor Spuren Cu!

2. Methode von Svirbely-Szent-Györgyi 76)

50 kg Paprika werden gemahlen und mit 1750 ccm heiß gesättigter Bariumacetatlösung versetzt. Nach 1stündigem Stehen preßt man die Flüssigkeit ab. Ausbeute etwa 40 Liter. Die Lösung ist bei Ausschluß von Luft 2—3 Wochen in der Kälte beständig. Man löst darin normales Bleiacetat zu 5 % und versetzt mit Ammoniak, bis die Lösung gegen Bromphenolblau schwach alkalisch reagiert. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert. Man suspendiert ihn in wenig Wasser

75) King und Mitarbeiter, J. of biol. Chem. 97, 325 (1932); 84, 771 (1929); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 1281 (1933).

76) Svirbely-Szent-Györgyi, Biochemic. J. 27, 279 (1933).

und versetzt mit 25%iger Schwefelsäure bis zum Umschlag von Thymolblau. Der Niederschlag von Bleisulfat wird abfiltriert. Man löst im Filtrat Bariumacetat zu 10% und verwirft den entstehenden Niederschlag. Das Filtrat wird mit 5—10% Bleiacetat ausgefällt. Dann macht man die Lösung gegen Bromthymolblau alkalisch. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und wie oben behandelt.

Die Filtrate (etwa 1500—2000 ccm) werden mit Ammoniak abgestumpft (Thymolblau noch nicht gebläut) und im Vakuum bei 20—30° auf 200—300 ccm eingeengt. Man fällt mit dem doppelten Volumen Methylalkohol und verwirft den unwirksamen Niederschlag. Das Filtrat wird mit demselben Volumen Aceton gefällt und der Niederschlag mit wenig Alkohol und Aceton extrahiert. Filtrate und Extrakte werden im Vakuum zur Sirupkonsistenz eingeengt, dann mit 100 ccm Methylalkohol und 500 ccm Aceton versetzt. Man filtriert vom Unlöslichen ab und wäscht mit wenig Methylalkohol aus. Die Waschflüssigkeit wird mit Aceton gefällt. Das Filtrat wird mit der ursprünglichen Lösung vereinigt.

Man versetzt die Filtrate mit demselben Volumen wasserfreiem, frisch destilliertem Äther, dekantiert die überstehende Lösung ab und extrahiert den Niederschlag mit wenig Methylalkohol. Der Extrakt wird mit Äther und Aceton behandelt und das Filtrat mit der Hauptmenge vereinigt.

Die Lösungen werden im Vakuum zur Sirupkonsistenz eingeengt. Der Sirup wird in großen Kristallisierschalen über Schwefelsäure aufbewahrt. Man stellt granulierte NaOH in denselben Exsikkator. Bei der Trocknung scheidet sich die Ascorbinsäure in Kristallen ab, die von der Hauptmasse durch Waschen mit Methylalkohol getrennt werden. Die Kristalle können mit Aceton nachgewaschen und im Vakuum getrocknet werden.

Die Substanz hat den Schmelzpunkt 187—189°. Ausbeute: 6,5 g für 10 Liter Saft. Wirksamkeit im 65-Tage-Versuch: 0,5 mg pro die.

Zur Reinigung werden die Kristalle in einem Gemisch von 3 Teilen Methylalkohol und 2 Teilen Dioxan gelöst (für jedes Gramm etwa 5 ccm Gemisch). Die Lösung wird im Vakuum eingeengt und über Nacht der Kristallisation in der Kälte überlassen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Schmelzpunkt 192°.

Darstellung der Monoacetonascorbinsäure: 20 g Ascorbinsäure werden mit 500 ccm Aceton und 50 g wasserfreiem Kupfersulfat 24 Stunden geschüttelt. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum auf 1/3 eingeengt. Nach Zugabe des doppelten Volumens Petroläther kristallisiert die Monacetonascorbinsäure in farblosen Prismen. Sie werden in Aceton gelöst und durch Zugabe von Petroläther erneut gefällt. Die Ausbeute beträgt 70%.

Die Substanz wird durch heißes Wasser leicht zerlegt. Die wiedergewonnene Ascorbinsäure hat die volle biologische Wirksamkeit.

Tabelle 107

Fed daily	No. of animals	Average survival (65 days' test) days	Average scurvy score *)	Average gain in weight g.
Basal diet only	3	19	13	—98
1,5 cc. lemon juice	3	65	0	222
0,125 cc. paprika juice	2	53**)	7	—70
0,25 cc. ,,	3	53**)	3	33
0,5 cc. ,,	3	53**)	1	87
1 mg. monoacetone-ascorbic acid	4	65	1	100
1 mg. ascorbic acid from acetone derivative	5	65	0	243
0,5 mg. ascorbic acid from paprika	6	65	0	167
0,5 mg. ascorbic acid recryst. 5 times	4	65	1	129
Basal diet only	3	21	13	—83
1 cc. alkali glucose	6	19	17	—62

*) Highest possible score is 24.

**) Chloroformed owing to depletion of supply of paprika juice.

3. Methode von Tillmanns und Mitarbeiter 77)

Tillmanns und Mitarbeiter stellen das Vitamin C in guter Ausbeute aus Hagebutten her. Die Methode beruht auf fraktionierter Bleifällung, indem einmal in saurer, einmal in neutraler und schließlich in alkalischer Lösung in Aceton gefällt wird. Das Vitamin geht die ersten beiden Male nicht in den Niederschlag. Die letzte Fällung erfolgt durch Aceton, wobei aus dem Filtrat der vorhergehenden Fällung das Bleisalz des Vitamins fällt.

Reife, von Blüten befreite Hagebutten werden mit einem scharfen Messer halbiert und in einer Flasche mit der dreifachen Gewichtsmenge 0,01 n-Phosphorsäure versetzt. Nach Einleitung von Kohlensäure wird die Flasche mit einem Gäraufsatz versehen und 3 Tage sich selbst überlassen.

Die abgegossene und abgepreßte Flüssigkeit wird unter Stickstoff in der Apparatur von Naumann auf etwa 30 % Trockensubstanz eingeengt und darauf mit der 4—5fachen Menge Aceton gefällt. Man läßt über Nacht stehen und engt das Filtrat in derselben Weise auf 25—30 % Trockensubstanz ein.

Die Lösung wird mit demselben Volumen 10 %iger Bleiacetatlösung versetzt und unter Einleiten von Stickstoff 20—30 Minuten gerührt. Der Niederschlag wird abgeschleudert, das Filtrat abgehebert und der Niederschlag gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und die Filtrate vom Bleisulfid mit Kohlensäure behandelt. Man dampft im Vakuum zur Trockne, nimmt mit wenig Wasser auf und trocknet die Lösung auf Sand. (Der Sand muß vorher 2mal mit konzentriertem HCl und 1mal mit Königswasser und Salzsäure gründlich gekocht und gewaschen werden.) Der Sand wird mit der Vitaminlösung 1 Stunde im siedenden Wasserbad getrocknet (unter Stickstoff) und dann mit reinstem Methanol extrahiert (15 %ige Lösung).

Man fällt unter Stickstoff mit der 4—5fachen Menge Äther und befreit das Filtrat im Vakuum vom Äther. Man löst in Wasser zu 6—7 % Trockenrückstand und fällt mit Liquor plumbi subacet. (D.A.B. VI) bis zur sauren Lackmusreaktion. Die Fällung wird unter Stickstoff abgeschleudert.

Das Filtrat wird mit dem doppelten Volumen reinstem Aceton gefällt. Der Niederschlag wird in Aceton aufgeschwemmt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Bleisulfid wird entfernt. Die Lösung wird im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird 10—15 Minuten im Wasserbad bei 80-90° gelassen. Ausbeute an Wirksamkeit etwa 50—55 %.

Man löst unter Erwärmen in der gerade nötigen Menge Methanol und versetzt die Lösung mit dem zur Erzeugung einer Trübung ausreichenden Volumen peroxydfreiem Äther. Dann wird mit dem 3fachen Volumen niedrig siedendem Petroläther gefällt. Hierbei scheidet sich ein Öl ab, das über Nacht kristallisiert. Die überstehende Lösung und die Äther-Petrolätherschicht können erneut der Bleifällung unterworfen werden. Der kristalline Rückstand wird mit Aceton von —5° gewaschen, die Kristalle werden mit Äther bei —5° aus dem Kolben herausgespült und auf ein mit Aceton angefeuchtetes Filter gebracht. Das Filter wird im Vakuum getrocknet. Die Substanz ist meist noch gelblich gefärbt. Ausbeute 50—60 %. Man erhält aus 35 kg Hagebutten 5,7 g reines Vitamin. Man kann die Substanz aus Methanol mit Äther-Petroläther umfällen.

XII. Synthese des Vitamins C

Reichstein c. s. 78) sowie Baird-Haworth c. s. 79) stellen das Vitamin C synthetisch durch Anlagerung von Blausäure an das entsprechende Oson mit nachfolgender saurer Verseifung dar. l-Arabinose wird zunächst in das Osazon und weiter in das Oson überführt. Die Umwandlung des Osons in das Vitamin erfolgt nach folgender Formulierung:

77) Tillmanns c. s., Z. Unters. Lebensmitt. 65, 145 (1933).
78) Reichstein c. s., Helvet. chim. Acta 16, 1019 (1933); 17, 510 (1934).
79) Baird Haworth, Chem. Soc. 1933, 1419; 1934, 62.

		CN		C = NH		CO
H · C = O		HO · C		HO · C		HO · C
C = O		KO · C		KO · C (O-Brücke)		HO · C (O-Brücke)
CH · OH	$\xrightarrow{KCN}$	CH · OH	oder	CH	$\xrightarrow[+ H_2O]{+ 2 HCl}$	CH + NH_4Cl
CH · OH		CH · OH		CH · OH		CH · OH + KCl
CH_2 · OH		CH_2 · OH		CH_2 · OH		CH_2 · OH
Oson, offenkettig geschrieben						Ascorbinsäure

Darstellung des l-Arabinoson: 30 g l-Arabinosazon werden mit 500 ccm 92 %igem Alkohol, 3,8 Liter heißem destilliertem Wasser, 30 g Eisessig und 48 g Benzaldehyd 1,5 Stunden gekocht. Die Mischung wird darauf unter Rühren auf 50⁰ abgekühlt (ca. 1½ Stunde) und mit Eis weiter gekühlt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat 3mal mit viel Äther ausgeschüttelt.

Die Ausbeute beträgt etwa 6 g im Hochvakuum getrocknetes l-Arabinoson (40 % der Theorie). Die Trocknung erfolgt im Hochvakuum bei 40—50⁰.

Umsetzung des Osons mit Kaliumcyanid: Das Oson wird in 60—80 Teilen destilliertem Wasser gelöst und die Lösung mit Kohle entfärbt. Aus dem Filtrat wird die Luft durch Stickstoff vertrieben. Man versetzt vor dem Kaliumcyanidzusatz mit NaOH bis die Lösung fast neutral reagiert.

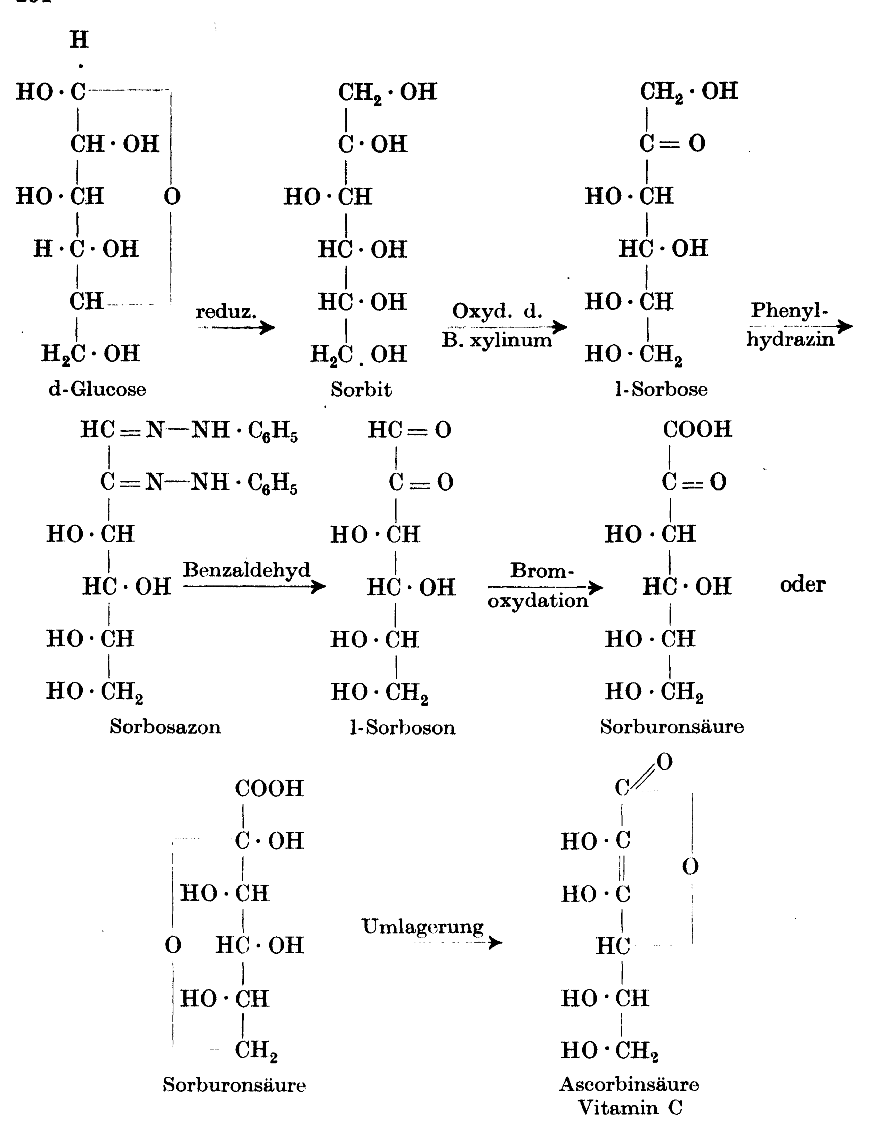
6 g Oson in 400 ccm Wasser (luftfrei!) werden bei 15—20⁰ mit einer Lösung von 3,6 g Kaliumcyanid in etwas Wasser versetzt. Man läßt in Stickstoffatmosphäre 10—15 Minuten stehen und gibt dann Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion hinzu (ca. 6 ccm konzentrierte Salzsäure). Die Lösung wird im Vakuum auf 20 ccm eingeengt. Man sättigt den Rückstand mit Kohlensäure und spült mit soviel Wasser, daß das Gesamtvolumen etwa 50 ccm beträgt, in ein kleines Kölbchen. Nach Entfernung der Luft durch Evakuieren wird gut verschlossen und 30—40 Stunden auf 48—50⁰ erwärmt. Darauf wird der Inhalt bei möglichst niedriger Temperatur im Vakuum eingeengt. (Wasserbadtemperatur maximal 40⁰.) Der feste Rückstand wird mit absolutem Alkohol aufgenommen, die anorganischen Salze abfiltriert und mit absolutem Alkohol gewaschen. Die Lösung beträgt etwa 80 ccm. Sie wird mit dem 10fachen Volumen frisch destilliertem Äther gefällt. Der Niederschlag, der noch reichliche Mengen Ascorbinsäure enthält, wird in 80 ccm absolutem Alkohol gelöst und erneut mit dem 10fachen Volumen Äther umgefällt. Die Ätherfällung gelingt nur aus saurer Lösung. Die klaren Lösungen, die die wirksame Substanz enthalten, werden im Vakuum vom Äther befreit. Nach dem Erkalten werden die alkoholischen Lösungen mit alkoholischem Bleiacetat vollkommen gefällt. Das quantitativ ausfallende Bleisalz der Ascorbinsäure wird abzentrifugiert, mit Alkohol gewaschen und nach Aufschwemmen in Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt (Aufschwemmen in CO_2-gesättigtem Wasser).

Das Filtrat vom Bleisulfid wird bei maximal 40⁰ im Vakuum zur Sirupkonstistenz eingeengt. Nach Animpfen des Sirups erfolgt sofort Kristallisation. Die Reinigung der Kristalle erfolgt durch Verreiben mit absolutem Alkohol und Nachwaschen mit Alkohol oder Aceton. Zur Reinigung der Ascorbinsäure ist Butylalkohol zu empfehlen.

Methode von Micheel 80). Die Methode beruht auf der Überführung der d-Glucose in die l-Sorbose über den Sorbit. Das Vitamin entsteht durch Umlagerung der Sorburonsäure. Die Synthese verläuft über folgende Stufen:

---

80) Micheel c. s., Z. physiol. Chem. 225, 13 (1934).



XIII. Eigenschaften des Vitamins C

Tabelle 108

Löslichkeit	Wasser leicht löslich; in organischen Lösungsmitteln, wie Methanol schwerer; löslich in n-Butylalkohol, Propylalkohol, extrahierbar durch Petroläther-Aceton 1 : 1, Petroläther-Butylalkohol 2 : 1 und 4 : 1, Petroläther-Propylalkohol 1 : 1 und 1 : 3; löslich in Aceton; Äther unlöslich.
Adsorbierbarkeit . .	Nicht adsorbierbar in neutraler Lösung an Fullererde oder Eisenhydroxyd. Adsorption zeigt p_H-Abhängigkeit.

Fällbarkeit	Aus dezitriertem Zitronensaft fällbar durch Bleiacetat.
Oxydation	In neutraler oder schwach alkalischer Lösung schon an der Luft oxydiert; leicht oxydierbar in saurer Lösung durch Jod und halogenierte Indophenolfarbstoffe (quantitative Bestimmung), C-haltige Lösungen werden an der Luft am besten mit Paraffin überschichtet. Sehr empfindlich gegen H_2O_2 und Oxydationsmittel.
Trocknung	Rasches Trocknen zerstört weniger als langsames. Bei Trocknen an der Luft oder Erhitzen tritt Zerstörung ein.
Temperaturbeständigkeit . .	Kochen vernichtet die gesamte C-Wirkung, ebenso Autoklavieren; bei Sauerstoffabschluß resistenter; in saurer Lösung resistenter.
Reduktionswirkung	Reduziert stark Fehling, Silbernitrat und Permanganat, schon in der Kälte. Es entsteht zunächst aus dem Vitamin eine reversibel oxydierte Substanz, die wieder in das Vitamin verwandelt werden kann. Die weitere Umwandlung des Vitamins ist irreversibel.
Besondere Eigenschaften	Kupferspuren beschleunigen die Zerstörung des Vitamins außerordentlich. UV.-Bestrahlung vernichtet durch Oxydation.
Wirksamkeit . . .	Die reine l-Ascorbinsäure, die ein weißes Pulver darstellt, das sich in Wasser mit stark saurer Reaktion löst (Schmelzpunkt 192°), vermittelt vollkommenen Skorbutschutz beim Meerschweinchen in Tagesdosen von 1,5—2 mg. Die Tagesdosis von 1 mg ist ausreichend, um während der ersten 90 Versuchstage das Auftreten von Wachstumsstörungen zu verhindern. Sie genügt aber nicht, um das Auftreten pathologischer Störungen zu verhüten. Das Vitamin C ist auch in hohen Dosen vollkommen ungiftig. Die Schutzwirkung von 0,5 mg l-Ascorbinsäure stimmt mit der Schutzwirkung von 1,5 ccm Zitronensaft überein. Die damit behandelten Tiere sind vor Gewichtsabnahme und makroskopischen Veränderungen noch zu einer Zeit geschützt, in der die unbehandelten Kontrollen schweren Skorbut zeigen. Dagegen sind bei den Tieren an Transversalschnitten durch die Schneidezahnwurzeln schon Skorbutveränderungen festzustellen.

Das Vitamin C_2

Die alte Ansicht von Bezssonoff 1), daß es mehr als ein C-Vitamin gibt, wird neuerdings durch Versuche von Euler bestätigt 2). Die auffällige Erscheinung, daß C-arm ernährte Meerschweinchen häufig an Pneumokokken-Pneumonie erkranken, findet dadurch eine Erklärung. Es zeigte sich nämlich, daß Tiere im Gewicht von 125—250 g, die mit einer vollständigen Diät aufgezogen wurden und dann auf eine C-freie Kost gesetzt werden, durch Ascorbinsäure und Zitronensaft in gleicher Weise vor Skorbut geschützt werden können. Die Schutzwirkung des Saftes ist allein durch die darin enthaltene Ascorbin-

1) Bezssonoff, Bull. Soc. Chim. biol. Paris 9, 568 (1927).
2) Euler, Ark. Kemi. Miner. Geol. 11, Nr. 19 (1933).

säure erklärlich. Infiziert man aber die C-arm ernährten Tiere mit Pneumokokken und gibt nun den einen Ascorbinsäure und den anderen Apfelsinensaft oder Zitronensaft, so werden die mit Saft behandelten Tiere wirksamer geschützt als der im Saft vorhandenen Menge an Ascorbinsäure entspricht.

Daraus ist zu vermuten, daß im Zitronensaft außer Ascorbinsäure noch ein Stoff vorkommt, der an der Schutzwirkung gegen Bakterien beteiligt ist. Der neue Faktor wird mit C_2 bezeichnet.

Vitamine zweifelhafter Natur

1. Der Forellenfaktor H

Nach McCay 3) und Mitarbeitern ist für das Wachstum junger Forellen eine Substanz nötig, die mit keinem der bisher bekannten Vitamine identisch ist. Dieser Stoff ist wasserlöslich, unlöslich in Alkohol und Äther. Trocknen zerstört ihn. Er wurde bisher nachgewiesen in Fleisch, roher Leber und in Magermilch.

Beziehungen dieser Substanz zu dem Faktor von Fixen sind nicht bekannt. Dieser ist eine Substanz, die X genannt, in roher Leber und Milch vorkommt und durch Trocknen zerstört wird. Sie schützt junge Ratten vor der schädlichen Wirkung einer Nahrung, die als Protein nur Eiereiweiß enthält.

2. Der antiparalytische Faktor

Keenan-Kline-Hart-Elvehjem und Halpin 4) beschrieben neuerdings bei Kücken eine Mangelkrankheit, die durch das Fehlen zweier bisher nicht klassifizierbarer Vitamine zustande kommt. Ernährt man 1 Tag alte Kücken mit einer Kost aus 24% Casein, 63,5% Dextrin, 2,5% Salz (Steenbock-Nelson-Gemisch 40, so modifiziert, daß es 0,246 g $MnSO_4$, $2H_2O$, 0,209 g $ZnCl_2$, 0,225 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ enthält), 8% Hefe und 2% Lebertran, so erreichen die Tiere mit 3 Wochen ein Gewicht von 70 g. Nach weiteren 2—3 Wochen zeigen sich typische Mangelerscheinungen, die unter dem Namen Paralyse zusammengefaßt werden.

Die hauptsächlichsten Erscheinungen sind Gewichtsstillstand, Gehstörungen und Koordinationsstörungen. Die Tiere liegen auf der Seite und fallen beim Versuch zu gehen bald wieder um. In allen Fällen wird eine deutliche Atrophie der Beinmuskeln festgestellt. Der Zustand dauert einige Tage bis zum Tode. Die pathologische Untersuchung ergab Degeneration des Zentralnervensystems. Die Befunde sind möglicherweise dieselben, die Pappenheimer und Mitarbeiter 5) und Hogan 6) an ihren Paralysevögeln beobachteten.

Die Erkrankung läßt sich weder verhüten noch heilen durch Zugabe der Vitamine A, D, E, C, B_1 oder B_2. Nur die Zugabe von Trockenleber, und zwar in Mengen von 18% der Kost, verhütet die Entstehung der Avitaminose. Der Gewichtsstillstand wird ebenfalls dadurch behoben, so daß die Tiere mit 6 Wochen ein Gewicht von 334 g erreichen. Die wirksame Substanz läßt sich durch Extraktion mit Äther oder 75%igem Alkohol aus der Leber nicht entfernen. Dagegen gelingt es, durch eine Wasserextraktion (3mal bei 60° je 12 Stunden) einen Teilfaktor in Lösung zu bringen.

Nach der Extraktion mit Wasser enthält der Leberrückstand noch die Substanz, die für das Wachstum der Tiere nötig ist. Eine Kost, die 18% der extrahierten Leberrückstände enthält, ermöglicht für 2—3 Wochen normales Wachstum der Kücken. Dann aber treten die Erscheinungen der Paralyse auf, und zwar viel schwerer als ohne Zugabe. Der wäßrige Leberextrakt enthält die Substanz, die der Paralyse entgegenwirkt. Tiere, die aber nur den wäßrigen Extrakt erhalten, wachsen schlecht.

---

3) McCay, Science 67, 249 (1928); J. Nutrit. 1, 233 (1929).
4) Keenan-Kline c. s., J. of biol. Chem. 103, 671 (1933).
5) Pappenheimer c. s., J. of exper. Med. 53, 11 (1931).
6) Hogan und Mitarbeiter, Missouri Agric. Exp. Stat. Res. Bull. 198 (1932).

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß Leber zwei Faktoren enthält, die für die normale Entwicklung der Kücken nötig sind, und zwar einen Wachstumsfaktor und einen Antiparalysefaktor.

Die biologische Auswertung des antiparalytischen Faktors

Zur Auswertung des antiparalytischen Faktors wird die obige Grunddiät unter Zusatz des Wachstumsfaktors verfüttert. Man gibt diesen in Form von fettfreien, extrahierten Leberrückständen (10% der Diät). Da der Wachstumsfaktor hitzestabil ist, der antiparalytische aber durch Autoklavieren zerstört wird, ist es möglich, durch Autoklavieren der Kostbestandteile das antiparalytische Vitamin zu entfernen.

Ernährt man Kücken mit einer solchen Kost, so erscheinen nach 2—3 Wochen ziemlich unvermittelt die Erscheinungen der Paralyse. Der Test wird prophylaktisch gehandhabt, indem die Tiere zur Diät täglich die zu untersuchende Substanz erhalten. Die Versuchsperiode dauert 6 Wochen. Es wird diejenige Menge bestimmt, die vollkommene Paralysefreiheit gewährleistet. Ein Beispiel geht aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle 109

Zahl der Kücken	Substanz	Paralyse nach Wochen	Gewicht nach Wochen 3	Gewicht nach Wochen 6	An Paralyse erkrankte Tiere	Tote nach 6 Wochen
14	Keine	3	100	—	13	9
12	Vitamin B_4 aus Leber	—	125	310	—	—
6	,, ,, Gras	—	90	262	—	—
4	,, ,, Alfalfa	4	75	150	2	—

Darstellung des antiparalytischen Faktors

Die Darstellung des antiparalytischen Faktors geschieht nach den von Kinnersley und Mitarbeitern ausgearbeiteten Verfahren für die Gewinnung des Vitamin B_4. Der unbekannte Faktor, der bei Kücken die Paralyse verhütet, scheint mit dem Rattenfaktor B_4 identisch zu sein.

600 g entfettete Leber werden 3mal mit Wasser extrahiert (600 ccm Wasser pro 100 g Material). Jede Extraktion wird 2 Stunden lang bei 60° ausgeführt. Die vereinigten Filtrate haben ein Volumen von etwa 12 Litern.

Man gibt für jeden Liter des Extrakts 10 ccm einer 25%igen neutralen Bleiacetatlösung hinzu und läßt über Nacht stehen. Der Extrakt wird dann mit der Bleilösung behandelt, bis keine weitere Fällung erfolgt. Die Lösung wird durch ein Buchner-Filter filtriert und mit heißem Baryt behandelt. (400 g BaOH auf 100 ccm kochendes Wasser.) Der Niederschlag wird abfiltriert. Das Filtrat wird (so schnell als irgend möglich) mit Schwefelsäure bis zum $p_H = 1$ versetzt. Nach 2stündigem Stehen wird der Niederschlag entfernt, p_H genau auf 1 eingestellt (Salzsäure). Diese Lösung wird nun 30 Minuten mit 90 g Kohle gerührt, die Kohle abfiltriert, mit 150 ccm einer 0,1 normalen Schwefelsäure gewaschen und mit 200 ccm 50%igem Alkohol (der mit Salzsäure bis zum $p_H = 1$ versetzt wurde) behandelt. Nach Stehen über Nacht wird die Lösung auf 70° erhitzt und die Kohle abfiltriert. Diese Elution wird 3mal wiederholt. Die Extrakte werden dann im Vakuum (nicht über 45°) auf ein solches Volumen eingeengt, daß 1 ccm 4 g Leber entspricht. Der Extrakt wird mit Natronlauge auf $p_H = 3$ gebracht und kühl aufbewahrt.

Die Lösung enthält etwa $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{5}$ der ursprünglich in der Leber vorhandenen Wirksamkeit. Vom Extrakt genügen täglich zur Verhütung der Paralyse während der ersten Woche eine Menge, die 2 g Leber entspricht. Für 2 Wochen sind 3 g und für 3, 4, 5 und 6 Wochen 6, 10, 14 und 16 g erforderlich.

Auch aus „Kentucky"-Blaugras kann nach Extraktion des trockenen Materials mit Äther ein wäßriger Extrakt hergestellt werden, der unter Umständen noch wirksamer ist als die Leberextrakte.

Der Faktor ist wahrscheinlich auch in der Hefe vorhanden, kann aber vielleicht erst nach Säurehydrolyse vom Kücken ausgenutzt werden (Hogan und Mitarbeiter).

3. Der Wachstumsfaktor

Es ist noch nicht untersucht, ob der hier aufgefundene Wachstumsfaktor der Leber identisch ist mit der Substanz, die Mapson 7), Daggs 8), Seegers-Smith 9) in der Leber auffanden.

Über ähnliche Untersuchungen und Beobachtungen an Kücken berichten Madsen-McCay und Maynard 10), Norris und Mitarbeiter 11) sowie Bethke und Mitarbeiter 12).

Es ergibt sich daraus, vorausgesetzt, daß die antiparalytische Substanz mit dem Vitamin B_4 identisch ist, daß Kücken nicht nur die Vitamine B_1 und B_2, sondern auch das Vitamin B_4 und dazu noch einen weiteren Wachstumsfaktor benötigen.

4. Der kohlenhydrathaushalt-regulierende Faktor von Wesson und Murrell

Wesson c. s. beschrieben bei Ratten auf einer fettarmen Kost die Erscheinung, daß zugeführte Kohlenhydrate abnorm in Fett verwandelt werden. Die Störung kann durch Zufuhr von Fett und Schmalz behoben werden. Es ist nicht sicher, ob es sich hierbei um die spezifische Wirkung eines wirklichen Vitamins handelt.

7) Mapson, Biochemic. J. 26, 970 (1932).
8) Daggs, J. Nutrit. 4, 443 (1931).
9) Seegers-Smith, J. of biol. Chem. 100, Proc./XXXVII (1933).
10) Madsen-McCay-Maynard, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 30, 1434 (1933).
11) Norris c. s., Poultry Sci. 9, 133 (1930); 10, 93 (1931).
12) Bethke c. s., Poultry Sci. 10, 355 (1931).

Sachverzeichnis

I

J

K

L

M

S

T

Buchdruckerei Richard Hahn (H. Otto) in Leipzig